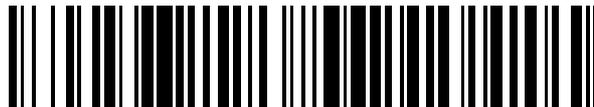


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 823**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2013 E 17157890 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3199552**

54 Título: **Anticuerpos anti-CEACAM5 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**20.11.2012 EP 12306444**

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

**12.08.2020**

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)  
54, rue La Boétie  
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BERNE, PIERRE-FRANÇOIS;  
BLANCHE, FRANCIS;  
BOUCHARD, HERVÉ;  
CAMERON, BÉATRICE;  
DABDOUBI, TARIK;  
DECARY, STÉPHANIE;  
FERRARI, PAUL y  
RAK, ALEXEY**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 778 823 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).

## DESCRIPCIÓN

## Anticuerpos anti-CEACAM5 y usos de los mismos

La presente invención describe anticuerpos que se unen específicamente a proteínas CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*, así como ácidos nucleicos aislados, vectores y células hospedantes que comprenden una secuencia que codifica dichos anticuerpos. La invención también describe inmunocombinados que comprenden dichos anticuerpos combinados o unidos a un agente inhibidor del crecimiento, y a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos o inmunocombinados de la invención. La invención describe el uso de los anticuerpos o inmunocombinados de la invención para el tratamiento de cáncer o para fines de diagnóstico.

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína implicada en la adhesión celular. El CEA fue por primera vez identificado en 1965 (Gold y Freedman, *J Exp Med*, 121, 439, 1965) como una proteína que se expresa normalmente en el intestino fetal durante los primeros seis meses de gestación, y se encuentra en cánceres del páncreas, hígado y colon. La familia del CEA pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La familia del CEA, que consiste en 18 genes, se subdivide en dos subgrupos de proteínas: el subgrupo de la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM) y el subgrupo de glicoproteínas específicas del embarazo (Kammerer y Zimmermann, *BMC Biology* 2010, 8:12).

En los seres humanos, el subgrupo CEACAM consiste en 7 miembros: CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8. Numerosos estudios han mostrado que CEACAM5, el cual es idéntico al CEA identificado originalmente, se expresa altamente en la superficie de las células de tumor colorrectal, gástrico, de pulmón, de mama, de próstata, de ovario, de cuello uterino así como de vejiga, y se expresa débilmente en muy pocos tejidos epiteliales normales tales como células epiteliales columnares y células caliciformes en el colon, células mucosas del cuello en el estómago y células epiteliales escamosas en el esófago y cuello uterino (Hammarström et al, 2002, en "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACR Press, Washington p. 375). De este modo, el CEACAM5 puede constituir una diana terapéutica adecuada para las estrategias dirigidas específicamente de tumor, tales como inmunocombinados. La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales dirigidos contra CEACAM5, y muestra que éstos pueden conjugarse con un agente citotóxico para inducir una actividad citotóxica capaz de matar células tumorales *in vitro* y para inducir regresión tumoral *in vivo*.

Los dominios extracelulares de los miembros de la familia de la CEACAM están compuestos por dominios repetidos similares a inmunoglobulina (similares a Ig) que se han clasificado en 3 tipos, A, B y N, de acuerdo con homología de secuencia. El CEACAM5 contiene siete de dichos dominios, concretamente N, A1, B1, A2, B2, A3 y B3.

Los dominios A1, A2 y A3 de CEACAM5, por una parte, y los dominios B1, B2 y B3, por otra parte, muestran altas homología de secuencia, presentando los dominios A de CEACAM5 humana de 84 a 87% de similitud de secuencia por parejas, y los dominios B de 69 a 80%. Además, otros miembros de la CEACAM humana que presentan dominios A y/o B en su estructura, concretamente CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 y CEACAM8, muestran homología con CEACAM5 humana. En particular, los dominios A y B de la proteína humana CEACAM6 presentan homología de secuencia con los dominios A1 y A3, y cualquiera de los dominios B1 a B3 de CEACAM5 humana, respectivamente, que son incluso mayores que las observadas entre los dominios A y los dominios B de CEACAM5 humana.

Se generaron numerosos anticuerpos anti-CEA con fines de diagnóstico o terapéuticos dirigidos a CEA. La especificidad frente a antígenos relacionados siempre se ha mencionado como una preocupación en este campo, como un ejemplo lo ha hecho Sharkey et al (1990, *Cancer Research* 50, 2823). Debido a las homología mencionadas anteriormente, algunos de los anticuerpos previamente descritos pueden demostrar unión a epítomos repetitivos de CEACAM5 presentes en los diferentes dominios de inmunoglobulina y mostrar reactividad cruzada frente a otros miembros de CEACAM tales como CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7, o CEACAM8, careciendo de especificidad frente a CEACAM5. La especificidad del anticuerpo anti-CEACAM5 es deseada a la vista de terapias dirigidas a CEA de manera que se una a células tumorales que expresan CEACAM5 humana, pero que no se una a algunos tejidos normales que expresan los demás miembros de CEACAM. Es importante destacar que se ha descrito que CEACAM1, CEACAM6 y CEACAM8 son expresadas por neutrófilos de primates humanos y no humanos (Ebrahimmnejad et al, 2000, *Exp Cell Res*, 260, 365; Zhao et al, 2004, *J Immunol Methods* 293, 207; Strickland et al, 2009 *J Pathol*, 218, 380), en los que han mostrado que regulan la granulopoyesis y que juegan un papel en la respuesta inmune.

Se ha descrito un combinado de fármaco de anticuerpo anti-CEACAM6, tal como el anticuerpo anti-CEACAM6 con maitansinoide desarrollado por Genentech ((Strickland et al, 2009 *J Pathol*, 218, 380), que se ha mostrado que induce toxicidad hematopoyética dependiente de CEACAM6 en primates no humanos. Esta toxicidad, atribuida a la acumulación del combinado de fármaco y anticuerpo en la médula ósea y a la depleción de granulocitos y sus precursores celulares, se consideró por los autores como un problema de seguridad importante. Así, más precisamente, para fines terapéuticos, la reactividad cruzada de un anticuerpo anti-CEACAM5 con CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7, o CEACAM8 puede disminuir el índice terapéutico del combinado por toxicidad incrementada en los tejidos normales. Así, existe una fuerte ventaja en obtener anticuerpos dirigidos

específicamente a CEACAM5 que no reaccionarían de manera cruzada con otras moléculas de la familia de la CEACAM, especialmente para uso como un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC) o con cualquier otro modo de acción que da como resultado la muerte de la célula diana.

Además, como se describe que CEACAM5 se expresa, aunque a un nivel bajo, en algunos tejidos celulares normales, es crítico desarrollar anticuerpos anti-CEACAM5 capaces de unirse a CEACAM5 humana así como a CEACAM5 de mono macaco (*Macaca fascicularis*), ya que dichos anticuerpos pueden ensayarse fácilmente en estudios toxicológicos preclínicos en monos macacos para evaluar su perfil de seguridad. Como se ha mostrado que la eficacia de los anticuerpos terapéuticos puede depender de la localización del epítipo en la diana, tanto en el caso de los anticuerpos funcionales (Doern et al. 2009, J. Biol. Chem 284 10254) como en el caso en el que están implicadas funciones efectoras (Beers et al. Semin Hematol 47:107-114), tiene que mostrarse que un anticuerpo con reactividad cruzada humano/mono se une a epítopos en el mismo dominio homólogo repetido semejante a Ig de proteínas humanas y de mono macaco.

Combinando la necesidad de la reactividad cruzada en especies de dichos anticuerpos con la especificidad para CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*, es decir, sin reactividad cruzada con otros miembros de CEACAM de *Macaca fascicularis* y humanos, se añade un grado adicional de complejidad, dadas las homologías de secuencia globales entre las proteínas de CEACAM humanas y de *Macaca fascicularis*.

De hecho, el alineamiento global por parejas de la secuencia de CEACAM5 de *Macaca fascicularis* con la secuencia de CEACAM5 humana (AAA51967,1/GI:180223, 702 aminoácidos) indicó solo un 78,5% de identidad. Los genes de CEACAM1, CEACAM5, y CEACAM6 de *Macaca fascicularis* se clonaron, y se realizó un alineamiento global de los dominios A, B y N humanos y de *Macaca fascicularis*. Este alineamiento predijo que hay muy pocas regiones, si hay alguna, para localizar un epítipo ideal que sería común a CEACAM5 humana y de macaco y no compartida por ningún otro miembro de la familia. Por estas razones, se esperaba que el desarrollo de anticuerpos con reactividad cruzada entre CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis* sin reactividad cruzada con otros miembros de CEACAM humanos y de *Macaca fascicularis* tuviera una baja probabilidad de éxito. De forma importante, los anticuerpos anti-CEACAM5 descritos previamente casi nunca se documentaron para reactividad cruzada con *Macaca fascicularis*, con muy pocas excepciones (MT111, véase más adelante).

Los anticuerpos anti-CEACAM5 humana ya se han usado en ensayos clínicos, tales como Immunomedics labetuzumab (también conocido como hMN14, Sharkey et al, 1995, Cancer Research 55, 5935). Se ha mostrado que este anticuerpo no se une a antígenos relacionados, pero no reacciona de manera cruzada con CEACAM5 de *Macaca fascicularis*. De forma importante, el anticuerpo MT111 de Micromet (también conocido como anticuerpo MEDI-565 de MedImmune) es un anticuerpo biespecífico que se une a CEACAM5 humana y CD3 humana (Peng et al., PLoS ONE 7(5): e3641; documento WO 2007/071426). Se afirma que MT111 se ha creado por la fusión de un fragmento variable de cadena única (scFv) a partir de un anticuerpo que reconoce CEACAM5 humana y de macaco con scFv de un anticuerpo que reconoce CD3 humana (póster de Oberst et al., AACR Annual Meeting April 2009 Denver, CO). También se ha dado a conocer que MT111 no se une a otros miembros de la familia de la CEACAM (Peng et al., PLoS ONE 7(5): e3641). MT111 se une a un epítipo conformacional en el dominio A2 de CEACAM5 humana. Este epítipo conformacional no está presente en una variante de corte y empalme de CEACAM5 humana, que se expresa concomitantemente con CEACAM5 de longitud completa en tumores (Peng et al., PLoS ONE 7(5): e3641). Además, no hay evidencia de que MT111 se una al mismo epítipo en CEACAM5 de *Macaca fascicularis*.

En un intento de producir nuevos anticuerpos frente a la proteína de superficie CEACAM5 con características óptimas para fines terapéuticos, los inventores han inmunizado ratones con proteínas recombinantes y con células tumorales. Han cribado cientos de hibridomas usando ELISA en varias proteínas recombinantes de la familia de la CEACAM, y citometría de flujo con líneas celulares relevantes, con el fin de seleccionar solo inmunoglobulinas (IgG) con el perfil ventajoso. Inesperadamente, fueron capaces de seleccionar clones de hibridoma y producir IgG maduras correspondientes que comprenden todas las características deseadas. Se unen específicamente al dominio A3-B3 de CEACAM5 humana con una alta afinidad, y no reconocen las proteínas humanas CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 y CEACAM8. En un contexto celular, estos anticuerpos presentan una alta afinidad por células tumorales (en el intervalo nanomolar). Además, estos anticuerpos también se unen a la proteína CEACAM5 de *Macaca fascicularis* con una relación de afinidad mono/humana menor o igual a 10. Los anticuerpos de la invención se unen específicamente al dominio A3-B3 de CEACAM5 de *Macaca fascicularis*, y no reconocen otros miembros de la familia de la CEACAM de *Macaca fascicularis*.

Seleccionando como diana el dominio A3-B3 de CEACAM5, estos anticuerpos tienen un potencial incrementado dirigido a tumores, ya que tienen la capacidad de unirse tanto a CEACAM5 humana de longitud completa como a su variante de corte y empalme identificada por Peng et al. (PLoS ONE 7(5): e3641).

Finalmente, se describe en la bibliografía que CEACAM5 es una proteína de superficie con poca internalización (revisado en Schmidt et al, 2008, Cancer Immunol. Immunother. 57, 1879), y por lo tanto puede no ser una diana favorable para los conjugados de anticuerpo fármaco. A pesar de lo que se ha dado a conocer en la técnica anterior, los inventores han mostrado que los anticuerpos que han producido son capaces de internalizar el complejo CEACAM5-anticuerpo después de la unión, e inducir actividad citotóxica en células tumorales in vitro cuando se combinan con un agente citotóxico. Los mismos anticuerpos combinados con un agente citotóxico también son

capaces de inhibir de forma importante el crecimiento tumoral en ratones que presentan tumores humanos de colon y estómago primarios.

Definiciones

5 Tal y como se usa en el presente documento, "CEACAM5" designa la "molécula de adhesión celular 5 relacionada con antígeno carcinoembrionario", también conocida como "CD66e" (Grupo de Diferenciación 66e) o CEA. CEACAM5 es una glicoproteína implicada en la adhesión celular. CEACAM5 se expresa altamente en particular en la superficie de las células de tumor colorrectal, gástrico, de pulmón y uterino.

10 Una secuencia de referencia de CEACAM5 humana de longitud completa, incluyendo el péptido señal (posiciones 1-34) y propéptido (posiciones 686-702), está disponible en la base de datos GenBank con el número de registro AAA51967,1 (SEQ ID NO:52). Se han identificado cinco SNP no sinónimos con una frecuencia mayor del 2% en la población caucásica, estando cuatro de ellos localizados en el dominio N (en las posiciones 80, 83, 112, 113), el último en el dominio A2 (en la posición 398) de CEACAM5 humana (SEQ ID NO:58). GenBank AAA51967,1 contiene el haplotipo principal (I80, V83, I112, I113 y E398).

15 Una secuencia del dominio extracelular de CEACAM5 de *Macaca fascicularis*, clonada por los inventores, se describe en SEQ ID NO:53.

20 Un "dominio" puede ser cualquier región de una proteína, definida generalmente sobre la base de homologías de secuencia y relacionada frecuentemente con una entidad estructural o funcional específica. Se sabe que los miembros de la familia de la CEACAM están compuestos por dominios similares a Ig. El término dominio se usa en este documento para designar ya sea dominios similares a Ig individuales, tal como "dominio N" o para grupos de dominios consecutivos, tal como "dominio A3-B3".

La organización de los dominios de CEACAM5 humana es como sigue (basado en la secuencia GenBank AAA51967.1; SEQ ID NO:52):

Dominios de CEACAM5 humana	Posiciones en SEQ ID NO:52
Dominio N	35 - 142
Dominio A1	143 - 237
Dominio B1	238 - 320
Dominio A2	321 - 415
Dominio B2	416 - 498
Dominio A3	499 - 593
Dominio B3	594 - 685

25 De acuerdo con esto, el dominio A3-B3 de CEACAM5 humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 499-685 de SEQ ID NO:52.

La organización de los dominios de CEACAM5 de *Macaca fascicularis* es como sigue (basado en la secuencia clonada del dominio extracelular; SEQ ID NO:53):

Dominios de CEACAM5 de <i>Macaca fascicularis</i>	Posiciones en SEQ ID NO:53
Dominio N-A1-B1	-1 - 286
Dominio A2-B2	-287 - 464
Dominio A3-B3	465 - 654

30 De acuerdo con esto, el dominio A3-B3 de CEACAM5 de *Macaca fascicularis* consiste en los aminoácidos en las posiciones 465-654 de SEQ ID NO:53.

Una "secuencia codificante" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de

aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificante para una proteína puede incluir un codón de inicio (habitualmente ATG) y un codón de parada.

Tal y como se usa en el presente documento, las referencias a proteínas específicas (por ejemplo, anticuerpos) pueden incluir un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos nativa, así como variantes y formas modificadas independientemente de su origen o modo de preparación. Una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos nativa es una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos como se obtiene de la naturaleza. Dichas proteínas con secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden prepararse usando métodos estándar recombinantes y/o sintéticos. Las proteínas con secuencia nativa engloban específicamente formas naturales truncadas o solubles, formas naturales variantes (por ejemplo, formas con corte y empalme alternativo), variantes y formas alélicas naturales incluyendo modificaciones post-traduccionales. Las proteínas con secuencia nativa incluyen proteínas que portan modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación, o fosforilación, u otras modificaciones de algunos restos de aminoácidos.

El término "gen" significa una secuencia de ADN que codifica, o corresponde a, una secuencia particular de aminoácidos que comprende todo o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede o no incluir secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan por ejemplo las condiciones en las que el gen se expresa. Algunos genes, que no son genes estructurales, pueden transcribirse a partir de ADN en ARN, pero no se traducen en una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden funcionar como reguladores de genes estructurales o como reguladores de la transcripción del ADN. En particular, el término gen puede estar destinado para la secuencia genómica que codifica una proteína, es decir, una secuencia que comprende secuencias reguladoras, promotoras, de intrones y de exones.

Una secuencia "al menos 85% idéntica a una secuencia de referencia" es una secuencia que tiene, en su longitud completa, 85%, o más, por ejemplo 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la longitud completa de la secuencia de referencia.

Un porcentaje de "identidad de secuencia" puede determinarse comparando las dos secuencias, alineadas de manera óptima sobre una ventana de comparación, en el que la parte de la secuencia de polinucleótido o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) comparado con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idéntico aparece en ambas secuencias para dar como resultado el número de posiciones concordantes, dividiendo el número de posiciones concordantes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar como resultado el porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se realiza por alineamiento por parejas global, por ejemplo usando el algoritmo de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970). El porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse fácilmente por ejemplo usando el programa Needle, con la matriz BLOSUM62, y los parámetros siguientes apertura de espacio = 10, extensión de espacio = 0,5.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es aquella en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga, tamaño o hidrofobia). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales con hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativa también pueden definirse tomando como base el tamaño del aminoácido.

Un "anticuerpo" puede ser un anticuerpo natural o convencional en el que dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro, y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Existen cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene distintos dominios de secuencia. La cadena ligera incluye dos dominios o regiones, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, referidos colectivamente como CH). Las regiones variables tanto de la cadena ligera (VL) como pesada (VH) determinan el reconocimiento de unión y especificidad al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes, tales como asociación de cadenas del anticuerpo, secreción, movilidad trans-placentaria, unión de complemento y unión a receptores de Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina, y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están compuestos por restos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los restos de las regiones no hipervariables o del marco (FR) influyen en la estructura global del dominio y por lo tanto en el sitio de combinación.

Las Regiones Determinantes de la Complementariedad o CDR se refieren por lo tanto a secuencias de aminoácidos que conjuntamente definen la afinidad de unión y especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de una inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, designadas CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L y CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo convencional, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y cadena ligera.

“Regiones del Marco” (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR, es decir, a aquellas porciones de las regiones variables de cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas en una única especie. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una cuatro FR, designadas FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, y FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, una “región del marco humana” es una región del marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85%, o más, por ejemplo 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) a la región del marco de un anticuerpo humano que se produce de forma natural.

En el contexto de la invención, la definición CDR/FR en una cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina se determina tomando como base la definición de IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org).

Tal y como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” indica anticuerpos convencionales y fragmentos de éstos, así como anticuerpos de dominio único y fragmentos de éstos, en particular cadena pesada variable de anticuerpos de dominio único, y anticuerpos quiméricos, humanizados, biespecíficos o multiespecíficos.

Tal y como se usa en el presente documento, anticuerpo o inmunoglobulina también incluye “anticuerpos de dominio único” que se han descubierto más recientemente y que son anticuerpos cuyas regiones determinantes de la complementariedad son parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos desprovistos naturalmente de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, anticuerpos de dominio único preparados por ingeniería. Los anticuerpos de dominio único pueden derivar de cualquier especie, incluyendo, pero no limitado a, ratón, ser humano, camello, llama, cabra, conejo, bovino. Los anticuerpos de dominio único pueden ser anticuerpos de dominio único naturales conocidos como anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. En particular, las especies *Camelidae*, por ejemplo camello, dromedario, llama, alpaca y guanaco, producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadena ligera. Los anticuerpos de cadena pesada de camélidos también carecen del dominio CH1.

La cadena pesada variable de estos anticuerpos de dominio único desprovistos de cadenas ligeras se conoce en la técnica como “VHH” o “nanocuerpo”. De manera similar a los dominios VH convencionales, los VHH contienen cuatro FR y tres CDR. Los nanocuerpos tienen ventajas sobre los anticuerpos convencionales: son aproximadamente diez veces más pequeños que las moléculas de IgG, y consecuentemente nanocuerpos funcionales plegados apropiadamente pueden producirse por expresión in vitro a la vez que se consigue un rendimiento alto. Además, los nanocuerpos son muy estables y resistentes a la acción de proteasas. Las propiedades y producción de nanocuerpos se han revisado por Harmsen y De Haard HJ (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov; 77(1):13-22).

La expresión “anticuerpo monoclonal” o “mAb”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de anticuerpo de una única secuencia de aminoácidos, que está dirigido contra un antígeno específico, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Un anticuerpo monoclonal puede producirse por un único clon de células B o hibridoma, pero también puede ser recombinante, es decir, producido por ingeniería de proteínas.

La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo preparado por ingeniería que, en su sentido más amplio, contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos distintos. En una realización, un anticuerpo quimérico comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, en asociación con un dominio CH y un dominio CL de otro anticuerpo, en una realización, un anticuerpo humano. Como el animal no humano, puede usarse cualquier animal tal como ratón, rata, hámster, conejo o similares. Un anticuerpo quimérico también puede indicar un anticuerpo multiespecífico que tiene especificidad por al menos dos antígenos diferentes.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo que tiene un origen no humano completa o parcialmente y que se ha modificado para reemplazar determinados aminoácidos, por ejemplo en las regiones del marco de los dominios VH y VL, con el fin de evitar o minimizar una respuesta inmune en los seres humanos. Los dominios constantes de un anticuerpo humanizado son la mayor parte de las veces dominios CH y CL humanos.

“Fragmentos” de anticuerpos (convencionales) comprenden una porción de un anticuerpo intacto, en particular la región de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, (dsFv)<sub>2</sub>, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, anticuerpos bivalentes, anticuerpos biespecíficos y

multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Un fragmento de un anticuerpo convencional también puede ser un anticuerpo de dominio único, tal como un anticuerpo de cadena pesada o VHH.

5 El término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50,000 y actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera completa están unidas entre sí a través de un enlace disulfuro. Habitualmente se obtiene entre fragmentos tratando IgG con una proteasa, papaína.

10 El término "F(ab')<sub>2</sub>" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que 2 fragmentos Fab idénticos unidos por un enlace disulfuro de la región bisagra. Habitualmente se obtiene entre fragmentos tratando IgG con una proteasa, pepsina.

El término "Fab'" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50,000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')<sub>2</sub>.

15 Un polipéptido Fv monocatenario ("scFv") es un heterodímero VH::VL enlazado covalentemente que habitualmente es expresada a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL enlazados por un enlazador que codifica un péptido. El fragmento scFv humano de la invención incluye las CDR que se mantienen en una conformación apropiada, por ejemplo usando técnicas de recombinación génica. Los fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes pueden formarse bien espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse acoplando scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)<sub>2</sub> divalente. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. "(dsFv)<sub>2</sub>" indica dos dsFv acoplados por un enlazador peptídico.

20 La expresión "anticuerpo biespecífico" o "BsAb" indica un anticuerpo que combina los sitios de unión a antígeno de dos anticuerpos en una única molécula. Así, los BsAb son capaces de unirse a dos antígenos diferentes simultáneamente. La ingeniería genética se ha usado cada vez más para diseñar, modificar y producir anticuerpos o derivados de anticuerpos con un conjunto deseado de propiedades de unión y funciones efectoras como se describe, por ejemplo, en el documento EP 2050764 A1.

La expresión "anticuerpo multiespecífico" indica un anticuerpo que combina los sitios de unión a antígeno de dos o más anticuerpos en una única molécula.

30 El término "anticuerpos bivalentes" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Por medio del uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

35 El término "hibridoma" indica una célula que se obtiene sometiendo una célula B preparada mediante la inmunización de un mamífero no humano con un antígeno a fusión celular con una célula de mieloma derivada de un ratón o semejante que produce un anticuerpo monoclonal deseado que tiene una especificidad antigénica.

40 Por "purificado" y "aislado" se quiere decir, cuando se refiere a una secuencia de polipéptido (es decir, el anticuerpo de la invención) o de nucleótido, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado", tal y como se usa en el presente documento, significa que están presentes al menos 75%, 85%, 95%, 96%, 97%, o 98% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que carece sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido en cuestión; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan perjudicialmente las características básicas de la composición.

45 Tal y como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Además, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

#### Anticuerpos

50 Los inventores han tenido éxito en la generación, cribado y selección de anticuerpos anti-CEACAM5 de ratón específicos que presentan una alta afinidad por la proteína CEACAM5 tanto humana como de *Macaca fascicularis* y que no reaccionan de manera cruzada significativamente con las proteínas CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 y CEACAM8 humanas, y con las proteínas CEACAM1, CEACAM6 y CEACAM8 de *Macaca fascicularis*.

Los inventores han determinado la secuencia de las cadenas pesada y ligera variables de dichos anticuerpos monoclonales, los denominados anticuerpos MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, y MAb5.

El denominado "anticuerpo MAb1" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia  
 EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS**GFTFSSY**AMSWVRQTPEKRLEWVATISSGG  
**SIYYLDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARPAYYG**NPAMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID  
 NO:31, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-H abarca las posiciones de  
 aminoácidos 1 a 25, CDR1-H abarca las posiciones de aminoácidos 26 a 33 (SEQ ID NO:1), FR2-H abarca  
 las posiciones de aminoácidos 34 a 50, CDR2-H abarca las posiciones de aminoácidos 51 a 58 (SEQ ID  
 NO:2), FR3-H abarca las posiciones de aminoácidos 59 a 96, CDR3-H abarca las posiciones de aminoácidos  
 97 a 109 (SEQ ID NO:3), y FR4-H abarca las posiciones de aminoácidos 110 a 120, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia  
 DILMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKAS**QNVGTN**VAWYQQKPGQSPKPLIY**SAS**YRYS  
 GVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNSYPLYTF**GGGKLEIK (SEQ ID NO:32, con las CDR  
 mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-L abarca las posiciones de aminoácidos 1 a 26, CDR1-L  
 abarca las posiciones de aminoácidos 27 a 32 (SEQ ID NO:4), FR2-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 33 a 49, CDR2-L abarca las posiciones de aminoácidos 50 a 52, FR3-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 53 a 88, CDR3-L abarca las posiciones de aminoácidos 89 a 98 (SEQ ID NO:6), y FR4-L abarca las  
 posiciones de aminoácidos 99 a 108.

El denominado “anticuerpo MAb2” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia  
 EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSAAS**GFV**FSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGG  
**GITYFPD**TVQGRFTVSRDNANTLYLQMNSLKSEDTAIYY**CAAHYFGSSGPF**AYWG QGTLVTVSA (SEQ ID  
 NO:33, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-H abarca las posiciones de  
 aminoácidos 1 a 25, CDR1-H abarca las posiciones de aminoácidos 26 a 33 (SEQ ID NO:7), FR2-H abarca  
 las posiciones de aminoácidos 34 a 50, CDR2-H abarca las posiciones de aminoácidos 51 a 58 (SEQ ID  
 NO:8), FR3-H abarca las posiciones de aminoácidos 59 a 96, CDR3-H abarca las posiciones de aminoácidos  
 97 a 109 (SEQ ID NO:9), y FR4-H abarca las posiciones de aminoácidos 110 a 120, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia  
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE**NIFSYLAWYQQKQK**SPQLLVYNTKTLAEG  
 VPSRFSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSY**YCQH**HYG**TP**FTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:34, con las CDR  
 mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-L abarca las posiciones de aminoácidos 1 a 26, CDR1-L  
 abarca las posiciones de aminoácidos 27 a 32 (SEQ ID NO:10), FR2-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 33 a 49, CDR2-L abarca las posiciones de aminoácidos 50 a 52, FR3-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 53 a 88, CDR3-L abarca las posiciones de aminoácidos 89 a 97 (SEQ ID NO:12), y FR4-L abarca las  
 posiciones de aminoácidos 98 a 107.

También se generó una variante del anticuerpo MAb2 introduciendo una sustitución K52R en el CDR2-L. Esta  
 variante, que se denomina en el presente documento “Mab2<sub>K52R</sub>”, tiene esencialmente la misma afinidad por  
 CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis* que MAb2.

El denominado “anticuerpo MAb3” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia  
 EVKLVESGGGLVKPGGSLTLP**CAASGF**TF**SRY**AMSWVRQTPEKRLEWVASISSGG  
**DTYYP**D**S**VKGRFTVSRDNARNILFLQMSSLRSEDTGMY**YCARV**NY**YDSS**FLD**W**WG QGTTLVTVSS (SEQ ID  
 NO:35, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-H abarca las posiciones de  
 aminoácidos 1 a 25, CDR1-H abarca las posiciones de aminoácidos 26 a 33 (SEQ ID NO:13), FR2-H abarca  
 las posiciones de aminoácidos 34 a 50, CDR2-H abarca las posiciones de aminoácidos 51 a 57 (SEQ ID  
 NO:14), FR3-H abarca las posiciones de aminoácidos 58 a 95, CDR3-H abarca las posiciones de  
 aminoácidos 96 a 108 (SEQ ID NO:15), y FR4-H abarca las posiciones de aminoácidos 109 a 119, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia  
 DIVMTQSRFMSTLEGDRVSVTCKAS**QNVGTN**VAWYQQKPGQSPKALII**SAS**YRY  
 SGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNNYPLYTF**GGGKLEIK (SEQ ID NO:36, con las CDR  
 mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-L abarca las posiciones de aminoácidos 1 a 26, CDR1-L  
 abarca las posiciones de aminoácidos 27 a 32 (SEQ ID NO:16), FR2-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 33 a 49, CDR2-L abarca las posiciones de aminoácidos 50 a 52, FR3-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 53 a 88, CDR3-L abarca las posiciones de aminoácidos 89 a 98 (SEQ ID NO:18), y FR4-L abarca las  
 posiciones de aminoácidos 99 a 108.

El denominado “anticuerpo MAb4” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia  
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS**GFTFSSY**DMSWVRQTPEKRLEWVAFISSY**G**  
**GR**TYADTVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDTAMFY**CAAHYFGTSGPF**AYWG QGTLVTVSA (SEQ ID  
 NO:37, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-H abarca las posiciones de

aminoácidos 1 a 25, CDR1-H abarca las posiciones de aminoácidos 26 a 33 (SEQ ID NO:19), FR2-H abarca las posiciones de aminoácidos 34 a 50, CDR2-H abarca las posiciones de aminoácidos 51 a 58 (SEQ ID NO:20), FR3-H abarca las posiciones de aminoácidos 59 a 96, CDR3-H abarca las posiciones de aminoácidos 97 a 109 (SEQ ID NO:21), y FR4-H abarca las posiciones de aminoácidos 110 a 120, y

- 5 - un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia  
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE**ENIYSYFAWYQQKQKSPQLLVYNAKILAEG**  
 VPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTY**YCYQHYYGIPFTFGSGTKLELK** (SEQ ID NO:38, con las CDR  
 10 mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-L abarca las posiciones de aminoácidos 1 a 26, CDR1-L  
 abarca las posiciones de aminoácidos 27 a 32 (SEQ ID NO:22), FR2-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 33 a 49, CDR2-L abarca las posiciones de aminoácidos 50 a 52, FR3-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 53 a 88, CDR3-L abarca las posiciones de aminoácidos 89 a 97 (SEQ ID NO:24), y FR4-L abarca las  
 posiciones de aminoácidos 98 a 107.

El denominado "anticuerpo MAb5" comprende:

- 15 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia  
 ELQLVESGGVLVPGGSLKLSCAAS**GFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVTYINSSG**  
**GITYYPDVTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLKSEDTAIYYCTAHYFGSSGPFAYWGQ** GTLVTVSA (SEQ ID  
 NO:39, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-H abarca las posiciones de  
 aminoácidos 1 a 25, CDR1-H abarca las posiciones de aminoácidos 26 a 33 (SEQ ID NO:25), FR2-H abarca  
 20 las posiciones de aminoácidos 34 a 50, CDR2-H abarca las posiciones de aminoácidos 51 a 58 (SEQ ID  
 NO:26), FR3-H abarca las posiciones de aminoácidos 59 a 96, CDR3-H abarca las posiciones de  
 aminoácidos 97 a 109 (SEQ ID NO:27), y FR4-H abarca las posiciones de aminoácidos 110 a 120, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia  
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE**ENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLTEG**  
 VPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSY**YCYQHYYGTPFTFGSGTKLEIK** (SEQ ID NO:40, con las CDR  
 25 mostradas en caracteres en negrita) en la que FR1-L abarca las posiciones de aminoácidos 1 a 26, CDR1-L  
 abarca las posiciones de aminoácidos 27 a 32 (SEQ ID NO:28), FR2-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 33 a 49, CDR2-L abarca las posiciones de aminoácidos 50 a 52, FR3-L abarca las posiciones de aminoácidos  
 53 a 88, CDR3-L abarca las posiciones de aminoácidos 89 a 97 (SEQ ID NO:30), y FR4-L abarca las  
 posiciones de aminoácidos 98 a 107.

30 Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo que se une a CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*.

En una realización, el anticuerpo de la invención se une a los dominios A3-B3 de CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*. Más específicamente, el anticuerpo puede unirse a los dominios A3-B3 humanos y de *Macaca fascicularis* indistintamente de si se expresan en forma aislada o si están presentes en un dominio extracelular soluble o proteína CEACAM5 de longitud completa anclada a membrana.

35 La especificidad de los anticuerpos por el dominio A3-B3 de CEACAM5 humana es ventajosa, ya que no se ha dado a conocer ningún SNP con una frecuencia mayor de 2% en la población caucásica en este dominio, lo que minimiza el riesgo de que el epítipo o epítipos de los anticuerpos en CEACAM5 estén alterados en parte de la población.

La invención también proporciona un anticuerpo que compite por la unión al dominio A3-B3 de las proteínas CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis* con un anticuerpo que comprende las cadenas pesadas y ligeras variables de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos denominados MAb1, MAb2, MAb2<sub>K52R</sub>, MAb3, MAb4, y MAb5, es decir, seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:31 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:32;
- 45 b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:33 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:34;
- c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:33 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:34 en la que K en la posición 52 se ha sustituido por R;
- 50 d) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:35 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:36;
- e) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:37 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:38; y
- f) un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:39 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:40.

La capacidad de un anticuerpo candidato para competir por la unión al dominio A3-B3 de proteínas CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis* con un anticuerpo que comprende las cadenas pesadas y ligeras variables de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, y MAb5 (de aquí en adelante en el presente documento, un anticuerpo "de referencia") puede ensayarse fácilmente, por ejemplo por ELISA competitivo en el que el antígeno (es decir, el dominio A3-B3 de CEACAM5 humana o de *Macaca fascicularis*, o un polipéptido que comprende o consiste en un fragmento de CEACAM5 humana o de *Macaca fascicularis* que incluye el dominio A3-B3, en particular el dominio extracelular de CEACAM5 humana o de *Macaca fascicularis*) está unido a un soporte sólido y se añaden dos disoluciones que contienen el anticuerpo candidato y el anticuerpo de referencia, respectivamente, y se deja que los anticuerpos compitan por la unión al antígeno. La cantidad de anticuerpo de referencia unido al antígeno puede medirse entonces y se puede comparar con la cantidad de anticuerpo de referencia unido al antígeno cuando se mide frente a un control negativo (por ejemplo, una disolución que no contiene anticuerpo). Una cantidad de anticuerpo de referencia unido en presencia del anticuerpo candidato, disminuida en comparación con la cantidad de anticuerpo de referencia unido en presencia del control negativo, indica que el anticuerpo candidato ha competido con el anticuerpo de referencia. Convenientemente, el anticuerpo de referencia puede estar marcado (por ejemplo, fluorescentemente) para facilitar la detección del anticuerpo de referencia unido. Pueden realizarse medidas repetidas con diluciones seriadas del anticuerpo candidato y/o de referencia.

De acuerdo con una realización, dicho anticuerpo, y por ejemplo el anticuerpo que compite por la unión al dominio A3-B3 de las proteínas CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis* con un anticuerpo como se define en b), c), e) y f) anteriores, se une a dos regiones del dominio A3-B3 de la proteína CEACAM5 humana que consiste en los aminoácidos en las posiciones 109-115 (SEQ ID NO:76) y aminoácidos en las posiciones 131-143 (SEQ ID NO:77) del dominio A3-B3 de la proteína CEACAM5 humana, respectivamente. De hecho, se ha identificado que un epítipo conformacional para el anticuerpo MAb2 pertenece a las regiones 109-115 y 131-143 del dominio A3-B3 de la proteína CEACAM5 humana, y estando MAb2, MAb4 y MAb5 estructuralmente muy relacionados, se asume por los inventores que dichos anticuerpos se unen al mismo epítipo.

De acuerdo con una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es específico para las proteínas de superficie CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*. En una realización, el anticuerpo de la invención no se une a, o no reacciona de manera cruzada significativamente con las proteínas CEACAM1 humana, CEACAM6 humana, CEACAM7 humana, CEACAM8 humana, CEACAM1 de *Macaca fascicularis*, CEACAM6 de *Macaca fascicularis* y CEACAM8 de *Macaca fascicularis*.

En particular, el anticuerpo no se une a, o no reacciona de manera cruzada significativamente con, el dominio extracelular de las proteínas CEACAM humana y de *Macaca fascicularis* mencionadas anteriormente.

La proteína CEACAM1 humana de longitud completa está disponible en la base de datos GenBank con el número de registro NP\_001703,2 (SEQ ID NO:11). El dominio extracelular de CEACAM1 humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 35-428 de SEQ ID NO:11. La proteína CEACAM6 humana de longitud completa está disponible en la base de datos GenBank con el número de registro NP\_002474,3 (SEQ ID NO:71). El dominio extracelular de CEACAM6 humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 35-327 de SEQ ID NO:71.

La proteína CEACAM7 humana de longitud completa está disponible en la base de datos GenBank con el número de registro NP\_008821,1 (SEQ ID NO:72). El dominio extracelular de CEACAM7 humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 36-248 de SEQ ID NO:72.

La proteína CEACAM8 humana de longitud completa está disponible en la base de datos GenBank con el número de registro NP\_001807,2 (SEQ ID NO:73). El dominio extracelular de CEACAM8 humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 35-332 de SEQ ID NO:73.

El dominio extracelular de CEACAM1 de *M. fascicularis* consiste en los aminoácidos en las posiciones 35-428 de la proteína de longitud completa, es decir, los aminoácidos 1-394 de SEQ ID NO:57.

El dominio extracelular de CEACAM6 de *M. fascicularis* consiste en los aminoácidos en las posiciones 35-327 de la proteína de longitud completa, es decir, los aminoácidos 1-293 de SEQ ID NO:61.

El dominio extracelular de CEACAM8 de *M. fascicularis* consiste en los aminoácidos en las posiciones 35-332 de la proteína de longitud completa, es decir, los aminoácidos 1-298 de SEQ ID NO:63.

La "afinidad" se define, en teoría, por la asociación en equilibrio entre el anticuerpo completo y el antígeno. Puede evaluarse experimentalmente por una variedad de métodos conocidos, tal como midiendo las velocidades de asociación y disociación con resonancia de plasmones superficiales, o midiendo la CE<sub>50</sub> (o K<sub>D</sub> aparente) en un ensayo inmunoquímico (ELISA, FACS). En estos ensayos, la CE<sub>50</sub> es la concentración del anticuerpo que induce una respuesta que es la mitad entre la línea base y el máximo después de algún tiempo de exposición especificado en una concentración definida de antígeno por ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) o célula que expresa el antígeno por FACS (Clasificación Celular Activada por Fluorescencia).

Un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno 1 (Ag1) “reacciona de manera cruzada” con el antígeno 2 (Ag2) cuando las  $CE_{50}$  están en un intervalo similar para ambos antígenos. En la presente solicitud, un anticuerpo monoclonal que se une a Ag1 reacciona de manera cruzada con Ag2 cuando la relación de la afinidad de Ag2 a la afinidad de Ag1 es igual a o menor que 10 (por ejemplo 5, 2, 1 o 0,5), midiéndose las afinidades con el mismo método para ambos antígenos.

Un anticuerpo monoclonal que se une a Ag1 “no reacciona de manera cruzada significativamente” con Ag2 cuando las afinidades son muy diferentes para los dos antígenos. La afinidad por Ag2 puede no ser medible si la respuesta de unión es demasiado baja. En la presente solicitud, un anticuerpo monoclonal que se une a Ag1 no reacciona de manera cruzada significativamente con Ag2 cuando la respuesta de unión del anticuerpo monoclonal a Ag2 es menor que 5% de la respuesta de unión del mismo anticuerpo monoclonal a Ag1 en el mismo entorno experimental y a la misma concentración de anticuerpo. En la práctica, la concentración de anticuerpo usada puede ser la  $CE_{50}$  o la concentración requerida para alcanzar la meseta de saturación obtenida con Ag1.

Un anticuerpo monoclonal “se une específicamente” a, o “es específico para” Ag1 cuando no reacciona de manera cruzada significativamente con Ag2. De acuerdo con esto, el anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una relación de afinidad por CEACAM5 humana a la afinidad por CEACAM5 de *Macaca fascicularis* que es  $\leq 10$ , por ejemplo  $\leq 5$ ,  $\leq 2$ ,  $\leq 1$ , o  $\leq 0,5$ . Así, el polipéptido de acuerdo con la invención puede usarse en estudios toxicológicos realizados en monos debido a que el perfil de toxicidad observado en monos sería relevante para anticipar efectos adversos potenciales en los seres humanos.

Una realización de la invención tiene una afinidad por CEACAM5 humana o CEACAM5 de *Macaca fascicularis*, o por ambas, que es  $\leq 10$  nM, por ejemplo  $\leq 5$  nM,  $\leq 3$  nM,  $\leq 1$  nM o  $\leq 0,1$  nM, por ejemplo una afinidad de 0,01 nM a 5 nM, o/y afinidad de 0,1 nM a 5 nM, o de 0,1 nM a 1 nM.

La afinidad por CEACAM5 humana o CEACAM5 de *Macaca fascicularis* puede determinarse como el valor de  $CE_{50}$  en un ELISA usando CEACAM5 recombinante soluble como antígeno de captura.

El anticuerpo de la invención también puede tener una constante de disociación aparente ( $KD$  aparente), como puede determinarse por análisis FACS en la línea celular tumoral MKN45 (DSMZ, ACC 409) o en células tumorales de xenoinjerto derivadas del paciente (CR-IGR-034P disponible en Oncodesign Biotechnology, colección tumoral CRReMEC), que es  $\leq 25$  nM, por ejemplo  $\leq 20$  nM,  $\leq 10$  nM,  $\leq 5$  nM,  $\leq 3$  nM o  $\leq 1$  nM. La  $KD$  aparente puede estar en el intervalo de 0,01-20 nM, o puede estar en el intervalo de 0,1-20 nM, 0,1-10 nM, o 0,1-5 nM.

Además, se ha mostrado que los anticuerpos de acuerdo con la invención son capaces de detectar la expresión de CEACAM5 por inmunohistoquímica en secciones tisulares congeladas y fijadas con formalina y embebidas en parafina (FFPE).

Los alineamientos de las secuencias de las regiones VH y VL de los anticuerpos MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 y MAb5 se muestran en la Figura 7. La comparación de las secuencias de CDR-H y CDR-L indica que, estructuralmente, MAb2, MAb4 y MAb5, por una parte, y MAb1 y MAb3, por otra parte, están muy relacionados, uniéndose dichos anticuerpos probablemente al mismo epítipo. La comparación de las secuencias CDR-H y CDR-L identifica además posiciones de CDR que están estrictamente conservadas entre los dos grupos de anticuerpos y se asume así que son importantes para la especificidad, mientras que las demás posiciones podrían tolerar una sustitución.

Los inventores han identificado además que los restos en las posiciones 101-109 de MAb2 VH (es decir, los restos de CDR3-H) y los restos en las posiciones 47-54 y 88-104 de MAb2 VL (es decir, las regiones que incluyen CDR2-L y CDR3-L, respectivamente) forman parte, o constituyen, el paratopo de anticuerpo para el dominio A3B3 de CEACAM5 humana.

Además, los restos en las posiciones 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, y 97 de MAb2 VL (es decir, en CDR1-L, CDR2-L y CDR3-L), y los restos en las posiciones 26 a 31, 51 a 58, 97, 103, 104, 107, y 109 de MAb2 VH (es decir, en CDR1-H, todos los CDR2-H y en CDR3-H) se han identificado por sustituciones de un solo aminoácido como neutros para unión a los dominios extracelulares de CEACAM5 humana y de macaco. Además, se ha mostrado que los restos en las posiciones 30 y 92 de MAb2 VL (es decir, en CDR1-L y CDR3-L), y los restos en las posiciones 98 y 100 de MAb2 VH (es decir, en CDR3-H), toleran una sustitución conservativa. Como MAb2, MAb4 y MAb5 portan el mismo conjunto de 6 CDR o unas muy relacionadas, se considera que las variaciones en las mismas posiciones de MAb4 o MAb5 en las secuencias VH o VL o tanto de VH y CL darán como resultado también anticuerpos variantes que mantienen la especificidad y/o afinidad de unión por CEACAM5 humana y de macaco.

De forma importante, habiéndose identificado todos los restos de CDR2-H como neutros para la unión a los dominios extracelulares de CEACAM5 humana y de macaco, los inventores asumieron que CDR2-H podría no participar en la interacción. De acuerdo con esto, en los anticuerpos de la invención, CDR2-H podría ser cualquier secuencia de 6 a 10 aminoácidos, siendo ésta la longitud normal de las secuencias de CDR2-H en los anticuerpos humanos.

De acuerdo con esto, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende:

- a) una CDR1-H que consiste en la secuencia  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$  (SEQ ID NO:83), en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$  y  $X_6$  es cualquier aminoácido; y
- una CDR2-H que consiste en una secuencia con una longitud de 6 a 10 aminoácidos, preferiblemente una secuencia con una longitud de 8 aminoácidos en la que cualquier aminoácido puede estar presente en cualquier posición; y
- 5 una CDR3-H que consiste en la secuencia  $X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$  (SEQ ID NO:84), en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ , y  $X_7$  es cualquier aminoácido,  $X_2$  es A o S, y  $X_3$  es Y, F o W; y/o
- b) una CDR1-L que consiste en la secuencia  $X_1X_2X_3X_4X_5Y$  (SEQ ID NO:85), en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_5$  es cualquier aminoácido, y  $X_4$  es Y, F o W; y
- 10 una CDR2-L que consiste en la secuencia  $NX_1X_2$ , en la que cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  es cualquier aminoácido; y
- una CDR3-L que consiste en la secuencia  $X_1X_2HX_3X_4X_5PX_6X_7$  (SEQ ID NO:86), en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$  y  $X_7$  es cualquier aminoácido,  $X_3$  es Y, F o W.
- En una realización, en la CDR1-H que consiste en una secuencia  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$  (SEQ ID NO:83),  $X_1$  es G, o  $X_2$  es F, o  $X_3$  es T, A o V, o  $X_4$  es F, o  $X_5$  es S, o  $X_6$  es S, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 En una realización, la CDR2-H consiste en una secuencia  $IX_1SX_2GGX_3T$  (SEQ ID NO:79), en la que  $X_1$  es S o N (en particular S),  $X_2$  es Y o G (en particular G),  $X_3$  es R o I. En una realización adicional  $X_3$  es I.
- En una realización, en la CDR3-H que consiste en una secuencia  $X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$  (SEQ ID NO:84),  $X_1$  es A o T, o  $X_4$  es T o S, o  $X_5$  es S, o  $X_6$  es F, o  $X_7$  es Y, o cualquier combinación de los mismos.
- 20 En una realización, en la CDR1-L que consiste en una secuencia  $X_1X_2X_3X_4X_5Y$  (SEQ ID NO:85),  $X_1$  es E, o  $X_2$  es N, o  $X_3$  es I, o  $X_5$  es S, o cualquier combinación de los mismos.
- En una realización, la CDR2-L consiste en una secuencia  $NX_1X_2$ , en la que  $X_1$  es A o T, y  $X_2$  es K o R.
- En una realización, en la CDR3-L que consiste en una secuencia  $X_1X_2HX_3X_4X_5PX_6X_7$  (SEQ ID NO:86),  $X_1$  es Q, o  $X_2$  es H, o  $X_4$  es G, o  $X_5$  es T, o  $X_6$  es F, o  $X_7$  es T, o cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende:
- 25 a) una CDR1-H que consiste en una secuencia  $GFX_1FSSYD$  (SEQ ID NO:78), en la que  $X_1$  es T, A o V; y
- una CDR2-H que consiste en una secuencia  $IX_1SX_2GGX_3T$  (SEQ ID NO:79), en la que  $X_1$  es S o N (en particular S),  $X_2$  es Y o G (en particular G),  $X_3$  es R o I; y
- una CDR3-H que consiste en una secuencia  $X_1AHYFGX_2SGPFAY$  (SEQ ID NO:80), en la que  $X_1$  es A o T (en particular A), y  $X_2$  es T o S; y/o
- 30 b) una CDR1-L que consiste en una secuencia  $ENIFSY$  (SEQ ID NO:10) o  $ENIYSY$  (SEQ ID NO:22); y
- una CDR2-L que consiste en una secuencia  $NX_1X_2$  en la que  $X_1$  es A o T, y  $X_2$  es K o R, en particular R; CDR2-L que consiste en particular en NAK, NTK y NTR; y
- una CDR3-L que consiste en una secuencia  $QHHYGTPFT$  (SEQ ID NO:12) o  $QHHYGIPFT$  (SEQ ID NO:24).
- De acuerdo con una realización, en CDR2-H,  $X_1$  es S o N,  $X_2$  es G y  $X_3$  es I.
- 35 De acuerdo con una realización, CDR2-H consiste en  $ISSGGGIT$  (SEQ ID NO:8),  $ISSYGGRT$  (SEQ ID NO:20) o  $INSGGGIT$  (SEQ ID NO:26).
- De acuerdo con una realización, en CDR3-H,  $X_1$  es A o T, y  $X_2$  es S.
- De acuerdo con una realización, CDR3-H consiste en  $AAHYFGSSGPFAY$  (SEQ ID NO:9),  $AAHYFGTSGPFAY$  (SEQ ID NO:21), o  $TAHYFGSSGPFAY$  (SEQ ID NO:27).
- 40 Cualquier combinación de estas realizaciones forma parte de la invención.
- Alternativamente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende:
- a) una CDR1-H que consiste en una secuencia  $GFTFSX_1YX_2$  (SEQ ID NO:81), en la que  $X_1$  es R o S, en particular S, y  $X_2$  es A o D; y
- 45 una CDR2-H que consiste en una secuencia  $ISSGGX_1X_2X_3$  (SEQ ID NO:82), en la que  $X_1$  está ausente, S o G (en particular G),  $X_2$  es D, Y o I, y  $X_3$  es T o I; y

una CDR3-H que consiste en una secuencia ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) o ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO:15); y/o

b) a CDR1-L que consiste en una secuencia QNVGTN (SEQ ID NO:4); y

una CDR2-L que consiste en una secuencia SAS; y

5 una CDR3-L que consiste en una secuencia QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) o QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18).

De acuerdo con una realización, CDR2-H consiste en una secuencia ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) o ISSGGDT (SEQ ID NO:14).

10 De acuerdo con una realización, CDR2-H consiste en una secuencia ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) y CDR3-H consiste en la secuencia ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3).

De acuerdo con una realización, CDR2-H consiste en ISSGGDT (SEQ ID NO:14) y CDR3-H consiste en la secuencia ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO:15).

15 De acuerdo con una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende las secuencias de CDR de las cadenas pesadas y/o ligeras de uno de los denominados anticuerpos anti-CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb2<sub>K52R</sub>, MAb3, MAb4, y MAb5.

Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo que comprende:

20 a) una CDR1-H de secuencia GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:1 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-H de secuencia ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:2 por una o más sustituciones de aminoácidos; CDR3-H de secuencia ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:3 por una sustitución de aminoácidos; CDR1-L de secuencia QNVGTN (SEQ ID NO:4) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:4 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-L de secuencia SAS o una secuencia que difiere de SAS por una sustitución de aminoácidos; y CDR3-L de secuencia QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:6 por una sustitución de aminoácidos; o

25 b) una CDR1-H de secuencia GFVFSSYD (SEQ ID NO:7) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:7 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-H de secuencia ISSGGGIT (SEQ ID NO:8) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:8 por una o más sustituciones de aminoácidos; CDR3-H de secuencia AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:9 por una o más sustituciones de aminoácidos; CDR1-L de secuencia ENIFSY (SEQ ID NO:10) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:10 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-L de secuencia NTK o NTR o una secuencia que difiere de NTK o NTR por una sustitución de aminoácidos; y CDR3-L de secuencia QHHYGTPFT (SEQ ID NO:12) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:12 por una sustitución de aminoácidos; o

30 c) una CDR1-H de secuencia GFTFSRYA (SEQ ID NO:13) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:13 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-H de secuencia ISSGGDT (SEQ ID NO:14) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:14 por una o más sustituciones de aminoácidos; CDR3-H de secuencia ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO:15) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:15 por una sustitución de aminoácidos; CDR1-L de secuencia QNVGTN (SEQ ID NO:16) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:16 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-L de secuencia SAS o una secuencia que difiere de SAS por una sustitución de aminoácidos; y CDR3-L de secuencia QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:18 por una sustitución de aminoácidos; o

35 d) una CDR1-H de secuencia GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:19 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-H de secuencia ISSYGGRT (SEQ ID NO:20) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:20 por una o más sustituciones de aminoácidos; CDR3-H de secuencia AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:21 por una o más sustituciones de aminoácidos; CDR1-L de secuencia ENIYSY (SEQ ID NO:22) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:22 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-L de secuencia NAK o una secuencia que difiere de NAK por una o más sustituciones de aminoácidos; y CDR3-L de secuencia QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:24 por una sustitución de aminoácidos; o

40 e) un anticuerpo que comprende una CDR1-H de secuencia GFVFSSYD (SEQ ID NO:25) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:25 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-H de secuencia INSGGGIT (SEQ ID NO:26) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:26 por una o más sustituciones de aminoácidos; CDR3-H de secuencia TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:27 por una o más sustituciones de aminoácidos; CDR1-L de secuencia ENIYSY (SEQ ID NO:28) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:28 por una sustitución de aminoácidos; CDR2-L de secuencia NAK o una secuencia que difiere de NAK por una o más sustituciones de aminoácidos; y CDR3-L de secuencia

QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30) o una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:30 por una sustitución de aminoácidos.

5 Uno o más aminoácidos individuales se pueden alterar por sustitución, en particular por sustitución conservativa, en una o más de las secuencias de CDR anteriores. Dicha alteración puede pretender, por ejemplo, eliminar un sitio de glicosilación o un sitio de desamidación, en conexión con la humanización del anticuerpo.

Tomando como base los alineamientos de las secuencias de las regiones VH y VL de los MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 y MAb5, y tomando como base las sustituciones de aminoácidos únicas en una variante del anticuerpo MAb2, puede sustituirse un aminoácido:

- 10 - en CDR1-H: en una o más de las posiciones 1 a 6, por ejemplo en la posición 3, de CDR1-H de secuencia GFVFSSYD (SEQ ID NO:7), GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) o GFAFSSYD (SEQ ID NO:25) o en la posición 6 de CDR1-H de la secuencia GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) o GFTFSRYA (SEQ ID NO:13); y/o
- 15 - en CDR2-H, en una o más de cualesquiera de las posiciones, o en una, dos o tres de las posiciones 2, 4, y 7 de CDR2-H de secuencia ISSGGGIT (SEQ ID NO:8), ISSYGGRT (SEQ ID NO:20) o INSGGGIT (SEQ ID NO:26), o en una, dos, o tres de las posiciones 6, 7 y 8 (en las que la secuencia tiene una longitud de 8 aminoácidos) de CDR2-H de secuencia ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) o ISSGGDT (SEQ ID NO:14); y/o véase anteriormente
- 20 - en CDR3-H, en una o más de las posiciones 1, 7, 8, 11 y 13, por ejemplo en una o dos de las posiciones 1 y 7 de CDR3-H de secuencia AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21), o TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27), o en la posición 3, 4, 7, 8, 9, 10, u 11 de secuencia ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) o ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO:15); y/o
- en CDR1-L, en una o más de las posiciones 1 a 5, en particular en una o más de las posiciones 1, 2, 3 y 5 o en la posición 4 de CDR1-L de secuencia ENIFSY (SEQ ID NO:10) o ENIYSY (SEQ ID NO:28); y/o
- en CDR2-L, en las posiciones 2 y/o 3 de secuencia NAK, NTK o NTR, en particular al menos en la posición 3 si K está presente. En dicho caso, R por ejemplo puede sustituirse por K en la posición 3 de CDR2-L; y/o
- 25 - en CDR3-L, en una o más de las posiciones 1, 2, 5, 6, 8 y 9, por ejemplo en la posición 6 de CDR3-L de secuencia QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) o QHHYGTPT (SEQ ID NO:30), o en la posición 5 de CDR3-L de secuencia QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) o QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18).

De acuerdo con una realización, en los anticuerpos de la invención:

- 30 - la posición 5 de CDR3-H de secuencia AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21), o TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27); y/o
- la posición 6 de CDR1-L de secuencia ENIFSY (SEQ ID NO:10) o ENIYSY (SEQ ID NO:28); y/o
- la posición 3 de CDR3-L de secuencia QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) o QHHYGTPT (SEQ ID NO:30)

no está (están) modificada(s).

35 De acuerdo con una realización, en CDR1-H de secuencia GFVFSSYD (SEQ ID NO:7), GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) o GFAFSSYD (SEQ ID NO:25), el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 3 de CDR1-H se selecciona del grupo que consiste en T, A o V.

De acuerdo con una realización, en CDR1-H de secuencia GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) o GFTFSRYA (SEQ ID NO:13), el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 6 de CDR1-H es R o S.

40 De acuerdo con una realización, en CDR3-H de secuencia AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21), o TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27), el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 1 de CDR3-H es A o T, y/o el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 7 de CDR3-H es T o S.

45 De acuerdo con una realización, en CDR3-H de secuencia ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) o ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO:15), el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 3 de CDR3-H es V o P, en la posición 4 es A o N, en la posición 7 es D o G, en la posición 8 es S o N, en la posición 9 es S o P, en la posición 10 es F o A, o en la posición 11 es W o Y.

De acuerdo con una realización, el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 4 de CDR1-L es Y o F.

50 De acuerdo con una realización, en CDR2-L de secuencia NAK, NTK o NTR, el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 2 de CDR2-L es A o T.

De acuerdo con una realización en CDR3-L de secuencia QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) o QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18), el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 5 de CDR3-L es N o S.

De acuerdo con una realización, en CDR3-L de secuencia QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) o QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30), el aminoácido que se sustituye por el aminoácido en la posición 6 de CDR3-L es I o T.

5 Cualquier combinación de las realizaciones anteriores forma parte de la invención.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo convencional, tal como un anticuerpo monoclonal convencional, o un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende o consiste en una IgG, o un fragmento de ésta.

10 La invención también proporciona anticuerpos como se ha definido anteriormente que comprenden además al menos el dominio variable de cadena pesada y/o el dominio variable de cadena ligera de uno de los cinco denominados anticuerpos anti-CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, y MAb5.

Así, una realización de la invención se refiere a un anticuerpo que comprende:

15 a) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:31, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:32, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

b) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:33, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:34, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

20 c) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:35, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:36, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

25 d) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:37, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:38, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

30 e) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:39, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:40, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta. Por ejemplo, la secuencia del dominio variable de cadena pesada o ligera puede diferir de la secuencia de referencia SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, según sea apropiado, en una o más sustituciones de aminoácidos, en particular en una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y/o sustitución o sustituciones con restos canónicos. En una realización, la secuencia del dominio variable de cadena pesada o ligera puede diferir de la secuencia de referencia SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 solo en una sustitución o sustituciones de aminoácidos conservativas.

35 Las alteraciones de la secuencia comparadas con la secuencia SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 estarán presentes esencialmente en una o más de las regiones del marco, FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L y/o FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Sin embargo, también son posibles las sustituciones de aminoácidos en una o más CDR. En una realización, la secuencia del dominio variable de cadena ligera puede diferir de la secuencia SEQ ID NO:34 al menos por una sustitución de K a R en la posición 52 de SEQ ID NO:34 (en CDR2-L).

40 El anticuerpo de la invención y un fragmento de éste pueden ser, respectivamente, un anticuerpo murino y un fragmento de un anticuerpo murino.

El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico, y en una realización, un anticuerpo murino/humano, por ejemplo un anticuerpo que comprende dominios variables murinos de cadenas pesada y ligera y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano. El polipéptido puede ser un fragmento de dicho anticuerpo.

45 De acuerdo con una realización, el anticuerpo de la invención es:

a) un anticuerpo quimérico que comprende, o consiste en, una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:41 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:42 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta (es decir, cadena pesada y/o ligera de chMAb1 como se describe en el ejemplo 5); o una cadena pesada y una cadena ligera o,

50 b) un anticuerpo quimérico que comprende, o consiste en, una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:43 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:44, o una

secuencia al menos 85% idéntica a ésta (es decir, cadena pesada y/o ligera de chMAb2 como se describe en el ejemplo 5); o una cadena pesada y una cadena ligera o,

5 c) un anticuerpo quimérico que comprende, o consiste en, una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:45 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:46 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta (es decir, cadena pesada y/o ligera de chMAb3 como se describe en el ejemplo 5); o una cadena pesada y una cadena ligera o,

10 d) un anticuerpo quimérico que comprende, o consiste en, una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:47 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:48 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta (es decir, cadena pesada y/o ligera de chMAb4 como se describe en el ejemplo 5); o una cadena pesada y una cadena ligera o,

e) un anticuerpo quimérico que comprende, o consiste en, una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:49 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:50 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta (es decir, cadena pesada y/o ligera de chMAb5 como se describe en el ejemplo 5); o una cadena pesada y una cadena ligera o,

15 f) un fragmento del anticuerpo quimérico definido en a), b), c), d) o e).

El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humanizado o un fragmento de un anticuerpo humanizado. En una realización, el anticuerpo de la invención puede resultar de la humanización de cualquiera de los anticuerpos quiméricos definidos anteriormente en a), b), c), d), e) o f).

20 En la técnica se conocen numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpo; véase, por ejemplo, la revisión por Almagro y Fransson (2008) *Front Biosci.* 13: 1619-1633. Un método usado comúnmente es el injerto de CDR, o remodelado de anticuerpo, que implica el injerto de las secuencias de CDR de un anticuerpo donante, generalmente un anticuerpo de ratón, en la estructura del marco de un anticuerpo humano de diferente especificidad. Como el injerto de CDR puede reducir la especificidad y afinidad de unión, y de este modo la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado con CDR, pueden introducirse retromutaciones en posiciones seleccionadas del anticuerpo injertado con CDR con el fin de retener la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo parental. La identificación de posiciones para posibles retromutaciones puede realizarse usando la información disponible en la bibliografía y en bases de datos de anticuerpos. Los restos de aminoácidos que son candidatos para retromutaciones son típicamente aquellos que están localizados en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras que los restos que están enterrados o que tienen un grado bajo de exposición en la superficie normalmente no se alterarán. Una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y retromutación es la modificación de superficie, en la que se retienen los restos de origen no humano no expuestos en la superficie, mientras que los restos de la superficie se alteran a restos humanos. Otra técnica alternativa se conoce como "selección guiada" (Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12, 899), y puede usarse para derivar a partir de un anticuerpo murino un anticuerpo completamente humano que conserva el epítipo y las características de unión del anticuerpo parental.

Para los anticuerpos quiméricos, la humanización implica típicamente la modificación de las regiones del marco de las secuencias de la región variable.

40 Los restos de aminoácidos que forman parte de una CDR no se alterarán típicamente en conexión con la humanización, aunque en determinados casos puede ser deseable alterar restos de aminoácidos individuales de CDR, por ejemplo para eliminar un sitio de glicosilación, un sitio de desamidación o un resto de cisteína no deseado. La glicosilación enlazada mediante N ocurre por la unión de una cadena oligosacáridica a un resto de asparagina en la secuencia del tripéptido Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación puede conseguirse mutando bien el resto de Asn o el Ser/Thr a un resto diferente, por ejemplo mediante una sustitución conservativa. La desamidación de los restos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como pH y exposición en la superficie. Los restos de asparagina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor medida en otras secuencias de dipéptido tales como Asn-Ala. Cuando está presente dicho sitio de desamidación, por ejemplo Asn-Gly, en una secuencia de CDR, puede ser deseable por lo tanto eliminar el sitio, típicamente por sustitución conservativa para eliminar uno de los restos implicados. La sustitución en una secuencia de CDR para eliminar uno de los restos implicados también se pretende que esté englobada por la presente invención.

55 Tomando el denominado "anticuerpo MAb2" como un ejemplo, un anticuerpo humanizado o fragmento de éste puede comprender las mutaciones siguientes en la cadena pesada variable: P en lugar de G en la posición 9; y/o G en lugar de V en la posición 10; y/o S en lugar de K en la posición 19; y/o R en lugar de K en la posición 43; y/o G en lugar de R en la posición 44; y/o A en lugar de F en la posición 60; y/o S en lugar de D en la posición 62; y/o K en lugar de Q en la posición 65; y/o T en lugar de K en la posición 87; y/o V en lugar de I en la posición 89; y/o S en lugar de A en la posición 113; proporcionándose las posiciones por referencia a SEQ ID NO:33.

Tomando aún el denominado “anticuerpo MAb2” como un ejemplo, un anticuerpo humanizado o fragmento de éste puede comprender las mutaciones siguientes en la cadena ligera variable: D en lugar de E en la posición 17; y/o R en lugar de T en la posición 18; y/o P en lugar de Q en la posición 40; y/o K en lugar de Q en la posición 45; y/o R en lugar de K en la posición 52; y/o D en lugar de Q en la posición 70; y/o T en lugar de K en la posición 74; y/o S en lugar de N en la posición 76; y/o A en lugar de G en la posición 84; y/o T en lugar de S en la posición 85; proporcionándose las posiciones por referencia a SEQ ID NO:34.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado que comprende, o consiste en, una cadena pesada que comprende las mutaciones siguientes, proporcionándose las posiciones por referencia a SEQ ID NO:33:

10 a) P en lugar de G en la posición 9; y G en lugar de V en la posición 10; y S en lugar de K en la posición 19; y R en lugar de K en la posición 43; y S en lugar de D en la posición 62; y K en lugar de Q en la posición 65; y T en lugar de K en la posición 87; o

15 b) P en lugar de G en la posición 9; y G en lugar de V en la posición 10; y S en lugar de K en la posición 19; y R en lugar de K en la posición 43; y G en lugar de R en la posición 44; y A en lugar de F en la posición 60; y S en lugar de D en la posición 62; y K en lugar de Q en la posición 65; y T en lugar de K en la posición 87; y V en lugar de I en la posición 89; y S en lugar de A en la posición 113; y/o

un anticuerpo humanizado que comprende una cadena ligera que comprende las mutaciones siguientes, proporcionándose las posiciones por referencia a SEQ ID NO:34:

20 c) D en lugar de E en la posición 17; y P en lugar de Q en la posición 40; y K en lugar de Q en la posición 45; y T en lugar de K en la posición 74; y S en lugar de N en la posición 76; o

d) D en lugar de E en la posición 17; y R en lugar de T en la posición 18; y P en lugar de Q en la posición 40; y K en lugar de Q en la posición 45; y D en lugar de Q en la posición 70; y T en lugar de K en la posición 74; y S en lugar de N en la posición 76; y A en lugar de G en la posición 84; y T en lugar de S en la posición 85; o

25 e) D en lugar de E en la posición 17; y R en lugar de T en la posición 18; y P en lugar de Q en la posición 40; y K en lugar de Q en la posición 45; y R en lugar de K en la posición 52; y D en lugar de Q en la posición 70; y T en lugar de K en la posición 74; y S en lugar de N en la posición 76; y A en lugar de G en la posición 84; y T en lugar de S en la posición 85.

30 En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado obtenido injertando las CDR de un anticuerpo de la invención en regiones del marco de anticuerpo alternativas, más específicamente en regiones del marco humanas. Tomando MAb2 como un ejemplo, las 6 CDR de MAb2<sub>K52R</sub> se han injertado en un marco humano que consiste en los genes IGHV3-23 e IGKV1D-39, y se introdujeron tres retromutaciones correspondientes a las posiciones 34 y 53 en la VL (SEQ ID NO. 34) y en la posición 50 en la VH (SEQ ID NO. 33) que dan como resultado un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:74 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:75.

35 En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado que comprende, o consiste en, una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO: 74, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; y/o una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:55 o SEQ ID NO:75 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta (dominios variables humanizados de cadenas pesada y ligera de MAb2).

40 En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:51 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:17 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:5 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:23 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:5 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:29 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:51 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:55 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 74 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 75 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta.

50 En dicho anticuerpo humanizado o fragmento de éste, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera pueden comprender regiones del marco aceptoras humanas. El anticuerpo humanizado comprende además dominios constantes de cadena pesada y ligera humana, cuando están presentes.

55 En una realización, el anticuerpo de la invención es el anticuerpo huMAb2-3 o una variante de éste, es decir, un anticuerpo aislado que se une al dominio A3-B3 de las proteínas CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*, y que comprende:

a) una cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO:87 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

b) una cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO:88 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o una cadena pesada y una cadena ligera.

5 En una realización, el anticuerpo de la invención es el anticuerpo huMAb2-4 (MAb2\_VL1d VH1-IgG1) o una variante de éste, es decir, un anticuerpo aislado que se une al dominio A3-B3 de las proteínas CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*, y que comprende:

c) una cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO:89 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; y/o

10 d) una cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO:90 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta.

15 El anticuerpo de acuerdo con la invención también puede ser un anticuerpo de dominio único o un fragmento de éste. En una realización de la invención, un fragmento de anticuerpo de dominio único puede consistir en una cadena pesada variable (VHH) que comprende las CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H de los anticuerpos como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo de cadena pesada, es decir, un anticuerpo desprovisto de cadena ligera, que puede contener o no un dominio CH1.

El anticuerpo de dominio único o un fragmento de éste también pueden comprender las regiones del marco de un anticuerpo de dominio único de camélido, y opcionalmente el dominio constante de un anticuerpo de dominio único de camélido.

20 El anticuerpo de acuerdo con la invención también puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento de anticuerpo humanizado, seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, (dsFv)<sub>2</sub>, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, y anticuerpos bivalentes.

25 El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico o multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpo, siendo al menos un fragmento de anticuerpo un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención. Los anticuerpos multiespecíficos son complejos proteicos polivalentes como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 2050764 A1 o US 2005/0003403 A1.

30 Los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos de acuerdo con la invención pueden tener especificidad por (a) el epítipo A3-B3 de CEACAM5 humana/de *Macaca fascicularis* al que está dirigido uno de los anticuerpos denominados MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 y MAb5, y (b) al menos otro antígeno diferente. De acuerdo con una realización, el al menos otro antígeno diferente no es un miembro de la familia de la CEACAM humana o de *Macaca fascicularis*, y en una realización, no es al menos uno o todos de CEACAM1 humana y de *Macaca fascicularis*, CEACAM6 humana y de mono, CEACAM7 humana y de *Macaca fascicularis*, y CEACAM8 humana y de *Macaca fascicularis*. De acuerdo con otra realización, el al menos otro antígeno diferente puede ser un epítipo en CEACAM5 humana o de *Macaca fascicularis* distinto de dicho epítipo A3-B3 al que está dirigido uno de los anticuerpos denominados MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 y MAb5.

35 Dichos anticuerpos pueden producirse por cualquier técnica muy conocida en la técnica. En una realización, dichos anticuerpos se producen por técnicas como se describe posteriormente en el presente documento. Los anticuerpos y fragmentos de éstos de acuerdo con la invención pueden usarse en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o estar contenidos en un vector, tal como una membrana o vesícula lipídica (por ejemplo, un liposoma).

40 Ácidos nucleicos, vectores y células hospedantes recombinantes

Un objeto adicional de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia que codifica un anticuerpo de la invención como se ha definido anteriormente.

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede estar incluida en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

45 Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo por el que una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula hospedante, para transformar el hospedante y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida.

Así, un objeto adicional de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

50 Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho polipéptido después de la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para una célula animal incluyen el promotor temprano y potenciador de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), promotor y potenciador LTR del virus de la

leucemia de ratón de Moloney (Kuwana Y et al. 1987), promotor (Mason JO et al. 1985) y potenciador (Gillies SD et al. 1983) de la cadena de inmunoglobulina H, y similares.

5 Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que pueda insertarse y expresarse un gen que codifica la región C del anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al. 1990), y similares.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR, y similares.

10 Otros ejemplos de vector viral incluyen vectores adenovirales, retrovirales, del virus del herpes y de AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse por técnicas conocidas en la técnica, tal como transfectando células empaquetadoras o por transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes defectuosos en la replicación pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 y WO 15 94/19478.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una célula que se ha transfectado, infectado o transformado mediante un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la invención.

20 El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "extraño" (es decir, extrínseco) en una célula hospedante, de manera que la célula hospedante expresará la secuencia o gen introducido para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por la secuencia o gen introducido. Una célula hospedante que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha "transformado".

25 Los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse para producir un anticuerpo recombinante de la invención en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedante y vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula hospedante.

30 Los sistemas de expresión habituales incluyen células hospedantes de *E. coli* y vectores plasmídicos, células hospedantes de insecto y vectores de baculovirus, y células hospedantes y vectores de mamíferos. Otros ejemplos de células hospedantes incluyen, sin limitación, células procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células de planta, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos celulares de mamíferos primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen célula de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC CRL1581), célula de ratón P3X63-Ag8,653 (ATCC CRL1580), célula CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa (referido de aquí en adelante en el presente documento como "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G et al; 1980), célula de rata YB2/3HL.P2.G11,16Ag,20 (ATCC CRL1662, referida de aquí en adelante en el presente documento como "célula YB2/0"), y similares. En una realización, se usa la célula YB2/0, ya que la actividad de ADCC de los anticuerpos quiméricos o humanizados se potencia cuando se expresan en esta célula.

40 Para la expresión de un anticuerpo humanizado, el vector de expresión puede ser de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existan en vectores separados, o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de un anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales, y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L del anticuerpo en células animales, el vector de expresión del anticuerpo humanizado es del tipo tándem (Shitara K et al. J Immunol Methods. 1994 Ene. 3; 167(1-2):271-8). Los ejemplos de vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18, y similares.

50 La presente invención también se refiere a un método para producir una célula hospedante recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se ha descrito anteriormente en una célula hospedante competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula hospedante recombinante obtenida, y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o segregan dicho anticuerpo.

Dichas células hospedantes recombinantes pueden usarse para la producción de anticuerpos de la invención.

Métodos para producir anticuerpos de la invención

55 Los anticuerpos de la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, bien sola o en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina por técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando el método bien conocido de fase sólida usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos y cadenas de inmunoglobulina de la invención pueden sintetizarse por técnicas de ADN recombinante como es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de la expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli)péptido deseado en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedantes eucariotas o procariotas adecuados que expresarán el polipéptido deseado, a partir de los cuales puede aislarse posteriormente usando técnicas muy conocidas.

La invención se refiere además a un método para producir un anticuerpo de la invención, método que comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula hospedante transformada de acuerdo con la invención; (ii) expresar dicho anticuerpo o polipéptido; y (iii) recuperar el anticuerpo o polipéptido expresado.

Los anticuerpos de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

En una realización, un anticuerpo quimérico humanizado de la presente invención puede producirse obteniendo secuencias nucleicas que codifican dominios VL y VH humanizados como se ha descrito previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolos en un vector de expresión para células animales que tiene los genes que codifican CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

Como el dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a las cadenas pesadas de inmunoglobulina humana, sin embargo son adecuadas aquellas de la clase IgG y también puede usarse una cualquiera de las subclases que pertenece a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Además, como la CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a las cadenas ligeras de inmunoglobulina humana, y pueden usarse aquellas de la clase kappa o de la clase lambda.

Los métodos para producir anticuerpos humanizados o quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica que son muy conocidas en la técnica (véase Morrison SL. et al. (1984) y los documentos de patente US 5.202.238; y US 5.204.244).

Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la técnica descrita en la solicitud W02009/032661, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; Patentes U.S. nºs 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o modificación de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)), e intercambio de cadenas (patente U.S. nº 5.565.332). La tecnología general de ADN recombinante para la preparación de dichos anticuerpos también es conocida (véase la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Solicitud de Patente Internacional WO 96/02576).

El Fab de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CEACAM5 con una proteasa, tal como papaína. También, el Fab puede producirse insertando secuencias de ADN que codifican ambas cadenas del Fab del anticuerpo en un vector para la expresión procariota, o para la expresión eucariota, e introduciendo el vector en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para expresar el Fab.

El F(ab')<sub>2</sub> de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CEACAM5 con una proteasa, pepsina. También, el F(ab')<sub>2</sub> puede producirse uniendo Fab' descrito anteriormente mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' de la presente invención puede obtenerse tratando F(ab')<sub>2</sub> que reacciona específicamente con CEACAM5 con un agente reductor, tal como ditiotreitól. También, el Fab' puede producirse insertando secuencias de ADN que codifican cadenas Fab' del anticuerpo en un vector para la expresión procariota, o un vector para la expresión eucariota, e introduciendo el vector en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para llevar a cabo su expresión.

El scFv de la presente invención puede producirse tomando secuencias de las CDR o dominios VH y VL como se ha descrito previamente, construyendo un ADN que codifica un fragmento scFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o eucariota, e introduciendo entonces el vector de expresión en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, puede usarse una tecnología muy conocida denominada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de acuerdo con la invención, e injertarlas en un marco de fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véase, por ejemplo, los documentos WO 98/45322; WO 87/02671; US 5.859.205; US 5.585.089; US 4.816.567; EP 0173494).

## Modificación de los anticuerpos de la invención

Se contemplan la o las modificaciones de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado injertando simplemente solo CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FR de VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión a antígeno puede reducirse en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios restos de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en CDR sino también en FR, pueden estar asociados directa o indirectamente con la actividad de unión a antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos restos de aminoácidos por diferentes restos de aminoácidos derivados de FR de VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Con el fin de resolver este problema, en los anticuerpos humanos injertados con CDR no humanas, se han hecho intentos para identificar, entre las secuencias de aminoácidos de FR de VH y VL de anticuerpos humanos, un resto de aminoácido que está directamente asociado con la unión del anticuerpo, o que interacciona con un resto de aminoácido de una CDR, o que mantiene la estructura tridimensional del anticuerpo y que está directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad de unión a antígeno reducida podría incrementarse reemplazando los aminoácidos identificados por restos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

En una realización de la presente invención, las seis CDR de un anticuerpo murino de la invención y tres aminoácidos de su marco se injertaron en un marco humano, dando como resultado un anticuerpo humanizado (MAb2\_VLg5VHg2) que tiene una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:74 y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:75, que mantuvo las características de unión a CEACAM5 humano y de macaco.

Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, e incluso así dar como resultado un anticuerpo o polipéptido funcional con características deseables.

Al realizar los cambios en las secuencias de aminoácidos del polipéptido, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos a la hora de conferir función biológica interactiva en una proteína se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático tomando como base sus características de hidrofobia y de carga; éstos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Un objeto adicional de la presente invención también engloba las variantes conservativas de la función de los polipéptidos de la presente invención.

Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de la actividad. Como la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen su actividad funcional biológica, pueden hacerse determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia proteica, y por supuesto en su secuencia de codificante del ADN, a la vez que no obstante se obtiene una proteína con propiedades similares. Se contempla así que pueden hacerse varios cambios en las secuencias de los anticuerpos de la invención, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos polipéptidos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y aun así dar como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, aun así obtener una proteína biológica funcionalmente equivalente. También es posible usar tecnologías bien establecidas, tales como estrategias de escaneo de alanina, para identificar, en un anticuerpo o polipéptido de la invención, todos los aminoácidos que pueden sustituirse sin pérdida significativa de unión al antígeno. Dichos restos pueden calificarse como neutros, ya que no están implicados en la unión al antígeno ni en mantener la estructura del anticuerpo. Una o más de estas posiciones neutras puede sustituirse por alanina o por otro aminoácido sin cambiar las características principales del anticuerpo o polipéptido de la invención.

Esto se ilustró en la presente invención por una estrategia de escaneo de alanina hecho en las CDR de MAb2<sub>K52R</sub>, que muestra que varias posiciones de estas CDR aparecen como neutras, ya que una alanina pudo sustituirse de hecho sin efecto significativo sobre la unión a CEACAM5 humana y de macaco. Por lo tanto se espera que las variantes de anticuerpo que resultan de dichas sustituciones neutras permanezcan funcionalmente idénticas al anticuerpo parental. En el ejemplo 6,4 proporcionado, se hicieron sustituciones en una variante humanizada de MAb2, pero es predecible que las mismas variaciones también mantendrían la función biológica cuando se introduzcan en cualquier variante de MAb2, Mab4 o Mab5, ya que estos anticuerpos relacionados portan todos el mismo conjunto de 6 CDR o unas muy relacionadas. Las posiciones neutras pueden definirse como restos 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, 97 en las secuencias de VL de esta familia de anticuerpos (SEQ ID NO:34 o SEQ

ID NO:38 o SEQ ID NO:40 o SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:23 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO:55 o SEQ ID NO:75), y restos 26 a 31, 51 a 58, 97, 103, 104, 107, 109 en las secuencias de VH de esta familia de anticuerpos (SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:37 o SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:51 o SEQ ID NO:74).

5 Las posiciones neutras pueden observarse como las posiciones en las que cualquier sustitución de aminoácidos podría incorporarse en las CDR de Mab2, Mab4 o Mab5. De hecho, en el principio del escaneo de alanina, la alanina se elige porque este resto no porta características estructurales o químicas específicas. Se admite generalmente que si una alanina puede sustituirse por un aminoácido específico sin cambiar las propiedades de una proteína, es probable que muchas otras, si no todas las sustituciones de aminoácidos también sean neutras. En el caso opuesto en el que la alanina es el aminoácido de tipo salvaje, si puede mostrarse que una sustitución específica es neutra, es probable que otras sustituciones también serían neutras.

10 En el ejemplo 6,4 proporcionado, también se han identificado cuatro posiciones en las CDR de Mab2, Mab4 o Mab5, que no se encontraron neutras en el contexto del escaneo de alanina, pero en las que un tipo conservativo de sustituciones de aminoácidos tiene un efecto neutro (restos 30 y 92 en las secuencias de VL y restos 98 y 100 en las secuencias de VH de esta familia de anticuerpos).

15 También se espera que dos o más mutaciones neutras en diferentes posiciones en cualquiera o en las dos secuencias de cadena de los anticuerpos, cuando se combinan, dieran como resultado habitualmente un anticuerpo que mantiene esencialmente las actividades funcionales del anticuerpo parental. Esto se ha ilustrado, por ejemplo, con las sustituciones combinadas LC\_T51A y LC\_T94A,, VL\_S31A y VH\_G54Y, o VL\_T53I y VH\_S53A en MAb2\_VLg5VHg2.

20 Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente, por lo tanto, en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen en cuenta cualquiera de las características anteriores son muy conocidas para los expertos en la técnica, e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

25 También puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención respecto a la función efectora, por ejemplo para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, pueden introducirse resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor capacidad para exterminar células mediada por complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Caron PC. et al. 1992; y Shopes B. 1992).

30 Otro tipo de modificación de aminoácidos del anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón de glicosilación original del anticuerpo, es decir, eliminando uno o más restos de hidratos de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La presencia de las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina, y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, crea un sitio de glicosilación potencial. La adición o supresión de sitios de glicosilación en el anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación enlazada mediante N).

40 Otro tipo de modificación implica la eliminación de secuencias identificadas, bien in silico o experimentalmente, como que dan como resultado potencialmente productos de degradación o heterogeneidad de las preparaciones de anticuerpo. Como ejemplos, la desamidación de los restos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como pH y exposición en la superficie. Los restos de asparagina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor medida en otras 45 secuencias de dipéptido tales como Asn-Ala. Cuando está presente dicho sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, en un anticuerpo o polipéptido de la invención, puede ser por lo tanto deseable eliminar el sitio, típicamente por sustitución conservativa para eliminar uno de los restos implicados. También se pretende que dichas sustituciones en una secuencia para eliminar uno o más de los restos implicados estén englobadas por la presente invención.

50 Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedante que tenga capacidades de glicosilación para glicosilación enlazada mediante N o mediante O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de 55 glutamina. Por ejemplo, dichos métodos se describen en el documento WO 87/05330.

La eliminación de cualquier resto de hidratos de carbono presente en el anticuerpo puede realizarse química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayor

parte o de todos los azúcares excepto el azúcar enlazante (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja el anticuerpo intacto. La desglicosilación química se describe por Sojahr H. et al. (1987) y por Edge, AS. et al. (1981). La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en anticuerpos puede conseguirse por el uso de una variedad de endoE- y exoglicosidasas, como se describe por Thotakura, NR. et al. (1987).

- 5 Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende el enlace del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes US n<sup>os</sup> 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

#### Inmunconjugados

- 10 La presente invención también incluye conjugados citotóxicos, o inmunconjugados, o conjugados anticuerpo-fármaco, o conjugados. Tal y como se usa en el presente documento, todos estos términos tienen el mismo significado y son intercambiables.

- 15 Los anticuerpos murinos, MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, y MAb5, se han conjugado a un maitansinoide (DM4) mediante un enlazador SPDB (piridilditiobutirato de N-succinimidilo). Se encontró que los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) resultantes tenían actividad citotóxica en células de cáncer gástrico humano MKN45, con valores de  $Cl_{50} \leq 1$  nM.

- 20 De manera similar, se prepararon conjugados de anticuerpo-SPDB-DM4 tomando como base una forma química de cada uno de MAb1, MAb2, MAb4, y MAb5. Los chMAb1-SPDB-DM4, chMAb2-SPDB-DM4, chMAb3-SPDB-DM4, y chMAb4-SPDB-DM4 resultantes se evaluaron a dos dosis frente a tumores medibles de colon primario CR-IGR-034P implantados s.c. en ratones hembra SCID. El análisis de los cambios en el volumen tumoral para cada tratado y control y el % de la regresión tumoral indicaron que chMAb2-SPDB-DM4, chMAb4-SPDB-DM4, y chMAb5-SPDB-DM4 eran altamente activos, al menos a la máxima dosis ensayada, y que chMAb2-SPDB-DM4 era activo a ambas dosis ensayadas. De forma importante, se obtuvieron porcentajes de regresión tumoral hasta 82%.

- 25 Los conjugados de anticuerpo-SPDB-DM4 también se prepararon usando las variantes humanizadas de MAb2 (huMAb2-1-SPDB-DM4, huMAb2-2-SPDB-DM4, y huMAb2-3-SPDB-DM4). ADC, que incluyen las variantes químicas (chMAb2-SPDB-DM4) o humanizadas de MAb2, se compararon con un anticuerpo-SPDB-DM4 irrelevante en busca de actividad citotóxica sobre células MKN45. Todas las variantes químicas y humanizadas de los ADC de MAb2 presentaron valores de  $Cl_{50} \leq 1$  nM, es decir, valores de  $Cl_{50}$  53 a 35 veces menores que la actividad citotóxica medida del conjugado de DM4 irrelevante, indicando de esta manera actividades citotóxicas mediadas por CEACAM5 de los conjugados anti-CEACAM5.

- 30 La actividad anti-tumoral de huMAb2-3-SPDB-DM4 y huMAb2-4-SPDB-DM4 se evaluó y se comparó con la de chMAb2-SPDB-DM4 frente a tumores medibles de colon primario CR-IGR-034P implantados s.c. en ratones hembra atímicos CD-1. Todos los conjugados fueron altamente activos a la máxima dosis ensayada (10 mg/kg).

- 35 La actividad anti-tumoral de huMAb2-3-SPDB-DM4 y huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 se evaluó adicionalmente frente a tumores de colon primarios medibles CR-IGR-034P implantados s.c. en ratones hembra SCID. huMAb2-3-SPDB-DM4 fue activo a 5 y 2,5 mg/kg, huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 fue muy activo a 5 mg/kg y activo a 2,5 mg/kg.

- La actividad anti-tumoral de huMAb2-3-SPDB-DM4 se evaluó adicionalmente frente a tumores de pulmón primarios medibles LUN-NIC-0014 implantados s.c. en ratones hembra SCID, y se encontró que era muy activo a 10 y 5 mg/kg.

- 40 Cada conjugado de DM4 incluyó un número medio de moléculas de DM4 (o "relación fármaco a anticuerpo" o "DAR") que variaba de 2 a 5.

De acuerdo con esto, la invención se refiere a "inmunconjugados" que comprenden un anticuerpo de la invención enlazado o conjugado a al menos un agente inhibidor del crecimiento, tal como un agente citotóxico o un isótopo radioactivo.

- 45 Un "agente inhibidor del crecimiento", o "agente anti-proliferativo", que puede usarse indistintamente, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula tumoral, bien *in vitro* o *in vivo*.

- 50 El término "agente citotóxico", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que la expresión "agente citotóxico" incluya agentes quimioterapéuticos, enzimas, antibióticos y toxinas tales como toxinas que son moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de éstas, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos más adelante. En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un taxoide, vincas, un maitansinoide o análogo de maitansinoide tal como DM1 o DM4, un fármaco pequeño, un derivado de tomamicina o pirrolobenzodiazepina, un derivado de criptoficina, un derivado de leptomicina, un análogo de auristatina o dolastatina, un profármaco, inhibidores de la topoisomerasa II, un agente alquilante de ADN, un agente anti-tubulina, un CC-1065 o análogo de CC-1065.
- 55

Tal y como se usa en el presente documento, "maitansinoides" indica maitansinoides y análogos de maitansinoide. Los maitansinoides son fármacos que inhiben la formación de microtúbulos y que son altamente tóxicos para las células de los mamíferos.

Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol.

- 5 Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados están descritos en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

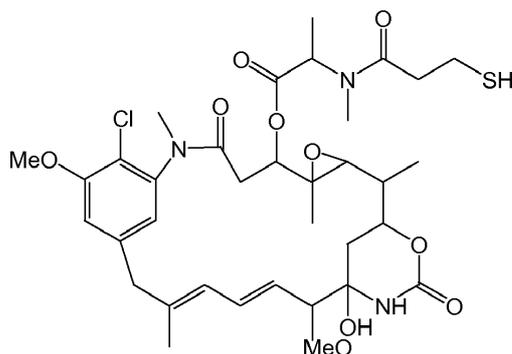
Los ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

- 10 (1) C-19-descloro (patente U.S. n<sup>o</sup> 4.256.746) (preparado por reducción con LAH de ansamitocina P2);  
 (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-descloro (patente U.S. n<sup>os</sup> 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración utilizando LAH); y  
 (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente U.S. n<sup>o</sup> 4.294.757) (preparado por acilación utilizando cloruros de acilo).

- 15 Los ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen modificaciones en otras posiciones incluyen:

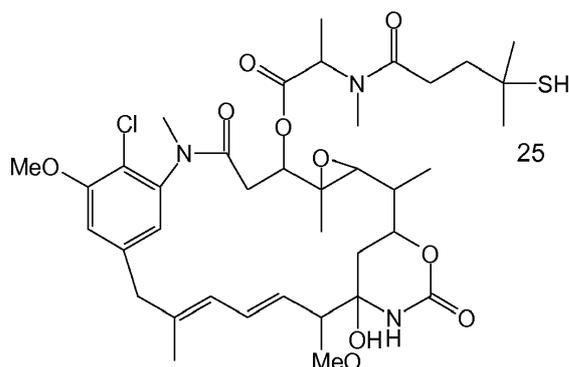
- (1) C-9-SH (patente U.S. n<sup>o</sup> 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>);  
 (2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH<sub>2</sub>OR) (patente U.S. n<sup>o</sup> 4.331.598);  
 20 (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc) (patente U.S. n<sup>o</sup> 4.450.254) (preparado de *Nocardia*);  
 (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente U.S. n<sup>o</sup> 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*);  
 (5) C-15-metoxi (patente U.S. n<sup>os</sup> 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*);  
 25 (6) C-18-N-desmetilo (patente U.S. n<sup>os</sup> 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y  
 (7) 4.5-desoxi (patente U.S. n<sup>o</sup> 4.371.533) (preparado mediante la reducción de maitansinol por tricloruro de titanio/LAH).

- 30 En una realización de la invención, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), denominado formalmente *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2'</sup>-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. DM1 se representa por la siguiente fórmula estructural (I):



(I).

En otra realización, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide DM4 que contiene tiol, denominado formalmente *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2'</sup>-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, como el agente citotóxico. DM4 se representa por la siguiente fórmula estructural (II):



(II)

En realizaciones adicionales de la invención, se pueden utilizar otras maitansinas, incluyendo maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que presentan una sustitución con mono- o dialquilo en el átomo de carbono que lleva el átomo de azufre. Éstos incluyen un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilada con un grupo acilo que porta un grupo sulfhidrido impedido, en el que el átomo de carbono del grupo acilo que porta la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 reactivos, y cualquier agregado que pueda estar presente en la disolución.

Los ejemplos de estos agentes citotóxicos y de los métodos de conjugación se proporcionan además en la solicitud WO 2008/010101, que se incorpora como referencia.

Se pretende que la expresión "isótopo radioactivo" incluya isótopos radioactivos adecuados para tratar cáncer, tales como At<sup>211</sup>, Bi<sup>212</sup>, Er<sup>169</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, In<sup>111</sup>, P<sup>32</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Sr<sup>89</sup>, e isótopos radioactivos de Lu. Dichos radioisótopos emiten en general principalmente radiación beta. En una realización, el isótopo radioactivo es un isótopo emisor alfa, más precisamente Torio 227 que emite radiación alfa. Los inmunocombinados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse como se describe en la solicitud WO 2004/091668.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención están unidos covalentemente, directamente o a través de un enlazador escindible o no escindible, a al menos un agente inhibidor del crecimiento.

"Enlazador", tal y como se usa en el presente documento, significa un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un polipéptido a un resto de fármaco.

Los combinados pueden prepararse mediante métodos *in vitro*. Con el fin de enlazar un fármaco o profármaco al anticuerpo, se utiliza un grupo enlazador. En la técnica son bien conocidos los grupos enlazadores adecuados, e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos foto-lábiles, grupos lábiles a peptidasas y grupos lábiles a esterasas. La conjugación de un anticuerpo de la invención con agentes citotóxicos o agentes inhibidores del crecimiento puede hacerse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, que incluyen, pero no se limitan a, piridilditiobutirato de N-succinimidilo (SPDB), éster 4-[(5-nitro-2-piridinil)ditio]-2,5-dioxo-1-pirrolidinílico del ácido butanoico (nitro-SPDB), ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfo-butírico (sulfo-SPDB), (2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos fluorados bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta et al (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil metildietilen triaminopentaacético marcado en carbono (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido al anticuerpo (documento WO 94/11026).

El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil a ácidos, un enlazador sensible a peptidasas, un enlazador lábil a esterasas, un enlazador fotolábil o un enlazador que contiene disulfuro (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 5,208,020). El enlazador también puede ser un "enlazador no escindible" (por ejemplo, enlazador de SMCC) que podría dar lugar a una mejor tolerancia en algunos casos.

Alternativamente, puede prepararse, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de la invención y un polipéptido citotóxico o inhibidor del crecimiento. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del combinado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del combinado.

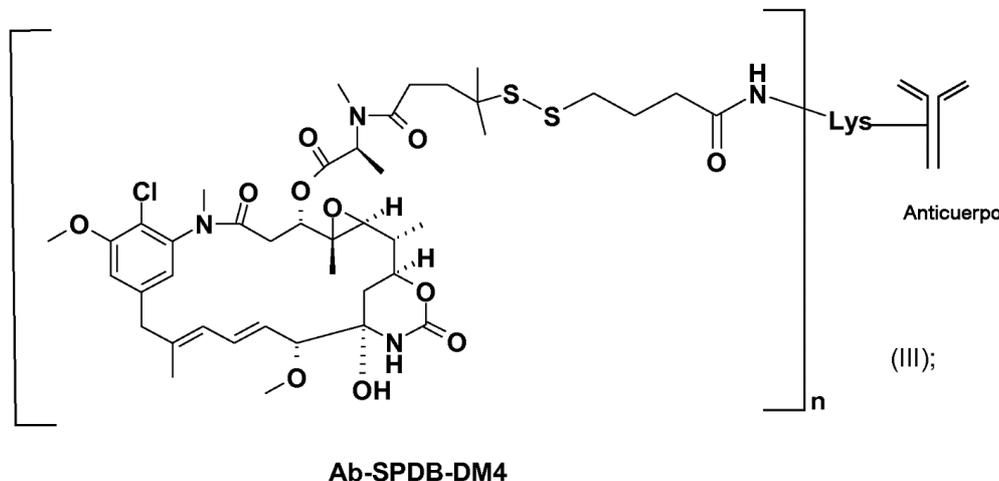
Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en Terapia con Profármacos Dirigida por Enzimas conjugando el polipéptido a una enzima que activa un profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco anticanceroso activo (véanse, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente U.S. nº 4.975.278). El componente enzimático del inmunocombinado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de una manera tal que lo convierte en su forma citotóxica más activa. Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero no están limitadas a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serrata, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como O-galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; P-lactamasa, útil para convertir fármacos derivatizados con P-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amínicos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Las enzimas se pueden unir covalentemente a los polipéptidos de la invención por técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales discutidos anteriormente.

De acuerdo con una realización, en el conjugado de la invención, el agente inhibidor del crecimiento es un maitansinoide; en una realización, DM1 o DM4.

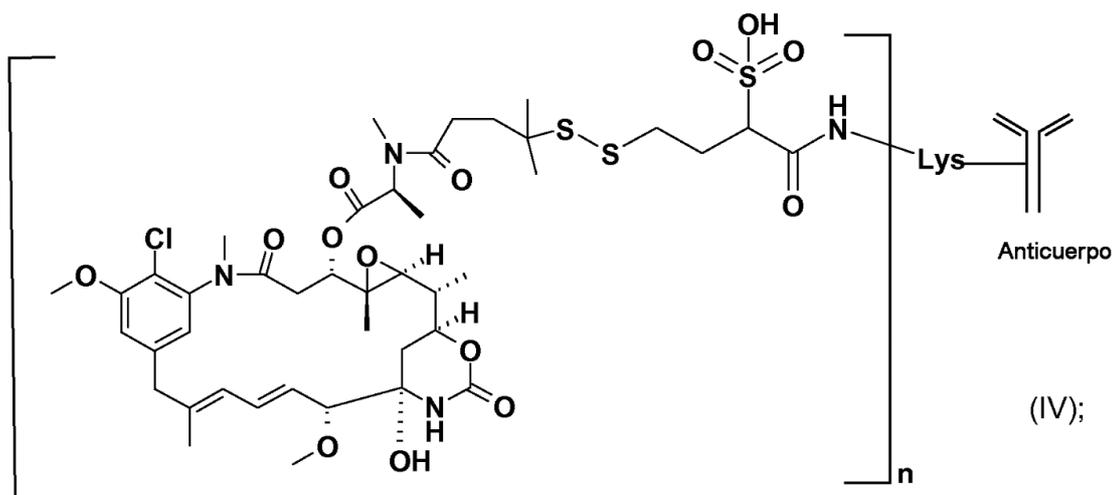
En dicho conjugado, el anticuerpo se conjuga a dicho al menos un agente inhibidor del crecimiento por un grupo enlazador. En una realización, dicho grupo enlazador es un enlazador escindible o no escindible, tal como SPDB, sulfo-SPDB, o SMCC.

El conjugado se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- i) un conjugado de anticuerpo-SPDB-DM4 de fórmula (III)



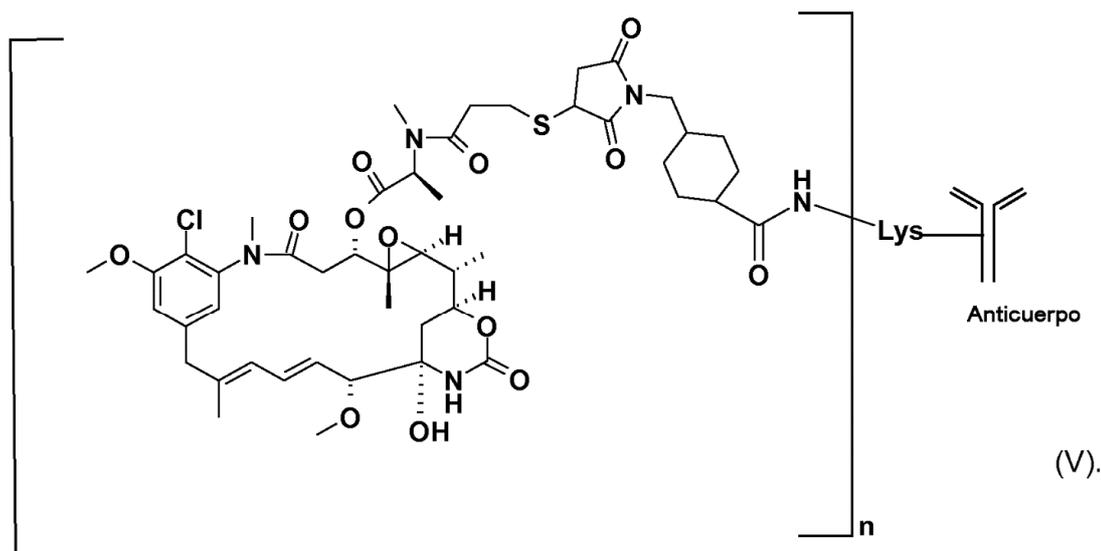
- ii) un conjugado de anticuerpo-sulfo-SPDB-DM4 de fórmula (IV)



**Ab-SulfoSPDB-DM4**

y

iii) un conjugado de anticuerpo-SMCC-DM1 de fórmula (V)



**Ab-SMCC-DM1**

- 5 En dicha realización, el anticuerpo incluido en el conjugado se selecciona del grupo que consiste en:
- i) un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:51 y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:17,
  - ii) un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:5 y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:23,
  - 10 iii) un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:5 y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:29, y
  - iv) un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:51 y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:55.

15 En una realización, el conjugado es un conjugado de fórmula (III), (IV) o (V) como se ha definido anteriormente, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID NO:5 y una cadena ligera de secuencia SEQ ID NO:29.

En general, el conjugado se puede obtener por un procedimiento que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto una disolución acuosa opcionalmente amortiguada de un agente de unión a células (por ejemplo, un anticuerpo de acuerdo con la invención) con disoluciones de un enlazador y un compuesto citotóxico;

5 (ii) después, separar opcionalmente el conjugado que se ha formado en (i) del agente de unión a células que no ha reaccionado.

La disolución acuosa del agente de unión a células puede amortiguarse con amortiguadores tales como, por ejemplo, fosfato de potasio, acetato, citrato o ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etanosulfónico (amortiguador de Hepes). El amortiguador depende de la naturaleza del agente de unión a células. El compuesto citotóxico está en disolución en un disolvente orgánico polar, por ejemplo sulfóxido de dimetilo (DMSO) o dimetilacetamida (DMA).

10 La temperatura de reacción normalmente está comprendida entre 20 y 40°C. El tiempo de reacción puede variar de 1 a 24 horas. La reacción entre el agente de unión a células y el agente citotóxico se puede monitorizar mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) con un detector refractométrico y/o UV. Si el rendimiento del conjugado es demasiado bajo, se puede ampliar el tiempo de reacción.

15 El experto en la técnica puede usar varios métodos de cromatografía diferentes para realizar la separación de la etapa (ii): el conjugado se puede purificar por ejemplo mediante SEC, cromatografía de adsorción (tal como cromatografía de intercambio iónico, IEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de afinidad, cromatografía de soporte mixto tal como cromatografía de hidroxipatita o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). También puede usarse la purificación por diálisis o diafiltración.

20 Tal y como se usa en el presente documento, el término "agregados" significa las asociaciones que se pueden formar entre dos o más agentes de unión a células, estando dichos agentes modificados o no por conjugación. Los agregados se pueden formar bajo la influencia de un gran número de parámetros, tales como una elevada concentración de agentes de unión a células en la disolución, el pH de la disolución, fuerzas de cizallamiento elevadas, el número de dímeros enlazados y su carácter hidrófobo, la temperatura (véase Wang y Gosh, 2008, J. Membrane Sci., 318: 311-316, y referencias citadas en dicho documento); nótese que la influencia relativa de algunos de estos parámetros no está claramente establecida. En el caso de proteínas y anticuerpos, el experto en la técnica se referirá a Cromwell et al. (2006, AAPS Journal, 8(3): E572-E579). El contenido de agregados se puede determinar con técnicas bien conocidas por el experto, tales como SEC (véase Walter et al., 1993, Anal. Biochem., 212(2): 469-480).

30 Después de la etapa (i) o (ii), la disolución que contiene el conjugado puede someterse a una etapa adicional (iii) de cromatografía, ultrafiltración y/o diafiltración.

El conjugado se recupera al final de estas etapas en una disolución acuosa.

De acuerdo con una realización, el conjugado de acuerdo con la invención se caracteriza por una "relación fármaco a anticuerpo" (o "DAR") que varía de 1 a 10, por ejemplo de 2 a 5, en particular de 3 a 4. Este es generalmente el caso de conjugados que incluyen moléculas de maitansinoide.

35 Este número DAR puede variar con la naturaleza del anticuerpo y del fármaco (es decir, el agente inhibidor del crecimiento) usado, junto con las condiciones experimentales usadas para la conjugación (como la relación agente inhibidor del crecimiento/anticuerpo, el tiempo de reacción, la naturaleza del disolvente y del codisolvente, si se usa). Así, el contacto entre el anticuerpo y el agente inhibidor del crecimiento da lugar a una mezcla que comprende varios conjugados que difieren entre sí por diferentes relaciones fármaco a anticuerpo; opcionalmente el anticuerpo desnudo; opcionalmente agregados. La DAR que se determina es así un valor medio.

40 Un método que puede usarse para determinar la DAR consiste en medir espectrofotométricamente la relación de la absorbancia de una disolución de conjugado sustancialmente puro a  $\lambda_D$  y a 280 nm. 280 nm es una longitud de onda usada generalmente para medir concentración de proteínas, tal como concentración de anticuerpo. La longitud de onda  $\lambda_D$  se selecciona para permitir discriminar el fármaco del anticuerpo, es decir, como ya conoce el experto,  $\lambda_D$  es una longitud de onda a la que el fármaco tiene una absorbancia alta y  $\lambda_D$  está lo suficientemente alejada de 280 nm como para evitar una superposición sustancial en los picos de absorbancia del fármaco y el anticuerpo.  $\lambda_D$  puede seleccionarse para ser 252 nm en el caso de moléculas de maitansinoide. Un método para calcular DAR puede obtenerse de Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, vol 525, 445, Springer Science:

50 Las absorbancias para el conjugado a  $\lambda_D$  ( $A_{\lambda_D}$ ) y a 280 nm ( $A_{280}$ ) se miden o bien sobre el pico monomérico del análisis por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) (que permite calcular el parámetro "DAR(SEC)") o bien usando un aparato espectrofotométrico clásico (que permite calcular el parámetro "DAR(UV)"). Las absorbancias se pueden expresar como se indica a continuación:

$$A_{\lambda_D} = (C_D \times \epsilon_{D\lambda_D}) + (C_A \times \epsilon_{A\lambda_D})$$

55 
$$A_{280} = (C_D \times \epsilon_{D280}) + (C_A \times \epsilon_{A280})$$

en las que:

- $C_D$  y  $C_A$  son respectivamente las concentraciones en la disolución del fármaco y del anticuerpo
- $\epsilon_{D\lambda_D}$  y  $\epsilon_{D280}$  son respectivamente los coeficientes molares de extinción del fármaco a  $\lambda_D$  y 280 nm
- $\epsilon_{A\lambda_D}$  y  $\epsilon_{A280}$  son respectivamente los coeficientes molares de extinción del anticuerpo a  $\lambda_D$  y 280 nm.

5 La resolución de estas dos ecuaciones con dos desconocidos conduce a las ecuaciones siguientes:

$$C_D = [(\epsilon_{A280} \times A_{\lambda_D}) - (\epsilon_{A\lambda_D} \times A_{280})] / [(\epsilon_{D\lambda_D} \times \epsilon_{A280}) - (\epsilon_{A\lambda_D} \times \epsilon_{D280})]$$

$$C_A = [A_{280} - (C_D \times \epsilon_{D280})] / \epsilon_{A280}$$

La DAR promedio se calcula a partir de la relación de la concentración de fármaco a la del anticuerpo:  $DAR = C_D/C_A$ .

#### Composiciones farmacéuticas

10 Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Así, otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un inmunoconjugado de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 La invención también se refiere a un polipéptido o un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, para uso como un medicamento.

“Farmacéuticamente” o “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de relleno sólido, semi-sólido o líquido, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar no tóxico de cualquier tipo.

25 Tal y como se usa en el presente documento, “vehículos farmacéuticamente aceptables” incluyen todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, aminoácidos, disolución salina, disolución salina amortiguada con fosfato, amortiguador de fosfato, acetato, citrato, succinato; aminoácidos y derivados tales como histidina, arginina, glicina, prolina, glicilglicina; sales inorgánicas de NaCl, cloruro de calcio; azúcares o polialcoholes tales como dextrosa, glicerol, etanol, sacarosa, trehalosa, manitol; tensioactivos tales como Polisorbato 80, Polisorbato 20, poloxámero 188; y similares, así como combinación de éstos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición, y la formulación también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la ruta de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y sexo del paciente, etc.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular, y similares.

40 En una realización, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede ser inyectada. Éstas pueden ser disoluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o de disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, y similares, o mezclas de estas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que después de la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de disolución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

La composición farmacéutica puede administrarse mediante dispositivos de combinación de fármacos.

Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse como una función de varios parámetros, y por ejemplo como una función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.

45 Para preparar composiciones farmacéuticas, puede disolverse o dispersarse una cantidad eficaz del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables. En todos los casos, la forma debe

ser estéril e inyectable con el dispositivo o sistema apropiado para el suministro sin degradación. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe proteger frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

5 Las disoluciones de los compuestos activos como una base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y sus mezclas y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estos preparados contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

10 Un polipéptido, anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos sódico, potásico, amónico, cálcico o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, glicina, histidina, procaína, y similares.

15 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), sus mezclas adecuadas, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión, y usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser causada por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con cualquiera de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado en vacío y liofilización, que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de éstos.

También se contempla la preparación de disoluciones más concentradas o altamente concentradas para inyección directa, en las que se considera el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones de los agentes activos en una pequeña área tumoral.

35 Al formularlas, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de disoluciones inyectables descrito anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

40 Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe amortiguarse adecuadamente si es necesario, y el diluyente líquido debe volverse isotónico en primer lugar con disolución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl, y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente ocurrirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

50 El anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede formularse en una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,01 a 100 miligramos, por dosis aproximadamente.

Además del anticuerpo o inmunoconjugado formulado para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación temporal; y cualquier otra forma usada actualmente.

55 En determinadas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de polipéptidos en células hospedantes. La formación y uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos para los expertos en la técnica.

Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con un tamaño de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ ) se diseñan generalmente usando polímeros capaces de degradarse in vivo. Las nanopartículas biodegradables de policianoacrilato de alquilo, o las nanopartículas biodegradables de polilactida o polilactida-co-glicolida que cumplen estos requisitos se contemplan para uso en la presente invención, y dichas partículas pueden prepararse fácilmente.

Los liposomas están formados por fosfolípidos que están dispersados en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas con bicapa multilaminares concéntricas (también denominadas vesículas multilaminares (MLV)). Las MLV tienen generalmente diámetros de 25 nm a 4  $\mu\text{m}$ . La sonicación de las MLV da como resultado la formación de vesículas unilaminares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una disolución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

#### Métodos terapéuticos y usos

Los inventores han mostrado que los cinco anticuerpos que han producido son capaces de internalizar el complejo de CEACAM5-anticuerpo después de la unión. Además, han mostrado que estos anticuerpos, combinados con un maitansinoide citotóxico (DM4), inducen actividad citotóxica en células tumorales humanas MKN45 in vitro. También han mostrado que estos inmunoconjugados inducen una actividad anti-tumoral importante in vivo en un modelo murino de xenoinjertos de tumor de colon primario humano derivado de un paciente, cuando se usan a una dosis de 5 mg/kg y 2,5 mg/kg, con una única inyección en el día 14 después del implante del tumor.

Así, los polipéptidos, anticuerpos, inmunoconjugados o composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles para tratar cáncer.

El cáncer que se va a tratar con anticuerpos, inmunoconjugados o composiciones farmacéuticas de la invención es un cáncer que expresa CEACAM5, en particular que sobreexpresa CEACAM5 comparado con células normales (es decir, no tumorales) del mismo origen tisular. La expresión de CEACAM5 por las células cancerosas puede ensayarse fácilmente, por ejemplo, usando un anticuerpo de acuerdo con la invención, como se describe en la sección siguiente "Usos diagnósticos", y en particular por un método inmunohistoquímico, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 8.

En una realización, el cáncer puede ser un cáncer colorrectal, de estómago, de pulmón, de cuello uterino, de páncreas, de esófago, de ovario, de tiroides, de vejiga, de endometrio, de mama, de hígado (por ejemplo colangiocarcinoma), de próstata o de piel. El cribado de un panel de tumores humanos por inmunohistoquímica usando un anticuerpo de ratón anti-CEACAM5 humana de acuerdo con la invención mostró de hecho tinción de anticuerpo en estos tipos de cánceres, como se describe con más detalles en el Ejemplo 8.

Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse solos o en combinación con cualquier agente inhibidor del crecimiento adecuado.

Los anticuerpos de la invención pueden conjugarse o enlazarse a un agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico o una enzima activadora de profármaco como se ha descrito previamente. Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles de hecho para dirigir dicho agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico o un profármaco a las células cancerosas que expresan o sobreexpresan CEACAM5 en su superficie.

También es bien conocido que los anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden dar lugar al agotamiento de células que portan el antígeno reconocido específicamente por el anticuerpo. Este agotamiento puede estar mediado por al menos tres mecanismos: citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC), lisis dependiente de complemento, e inhibición anti-tumoral directa del crecimiento tumoral mediante señales proporcionadas mediante el antígeno al que está dirigido el anticuerpo.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento a anticuerpos que están unidos a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro et al. (1997).

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que anticuerpos segregados unidos a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana que porta un antígeno, y posteriormente exterminar a la célula diana. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente US nº 5.500.362 o 5.821.337.

Así, un objeto de la invención se refiere a un método para tratar un cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, un anticuerpo, un inmunoconjugado o una composición farmacéutica de la invención.

5 En el contexto de la invención, el término “tratar” o “tratamiento”, tal y como se usa en el presente documento, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o la afección a la que se aplica tal término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. Por la expresión “tratar cáncer”, tal y como se usa en el presente documento, se quiere decir la inhibición del crecimiento de células malignas de un tumor y/o la progresión de metástasis de dicho tumor. Dicho tratamiento también puede dar lugar a la regresión del crecimiento tumoral, es decir, la disminución del tamaño de un tumor medible. En particular, dicho tratamiento da lugar a la regresión completa del tumor o metástasis.

10 De acuerdo con la invención, el término “paciente” o “paciente que lo necesita” está destinado a un ser humano o mamífero no humano afectado o con probabilidad de estar afectado con un tumor maligno. En particular, dicho paciente puede ser un paciente que se ha determinado que es susceptible a un agente terapéutico dirigido a CEACAM5, en particular a un anticuerpo o inmunoconjugado de acuerdo con la invención, por ejemplo de acuerdo con un método como se describe más adelante aquí.

15 Por una “cantidad terapéuticamente eficaz” del polipéptido de la invención se quiere decir una cantidad suficiente del polipéptido para tratar dicha patología cancerosa, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso total diario de los polipéptidos y composiciones de la presente invención lo decidirá el médico que atiende dentro del criterio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el trastorno que se va a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del polipéptido específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, y tasa de excreción del polipéptido específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o al mismo tiempo con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica el empezar con dosis del compuesto a niveles menores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado.

Otro objeto de la invención se refiere a un polipéptido, un anticuerpo, un inmunoconjugado o una composición farmacéutica de la invención para uso en el tratamiento de un tumor maligno.

30 El polipéptido, anticuerpo, inmunoconjugado o composición farmacéutica puede usarse para inhibir la progresión de metástasis de un tumor maligno.

Los polipéptidos de la invención pueden usarse en combinación con cualquier otra estrategia terapéutica para tratar un tumor maligno (por ejemplo, terapia adyuvante), y/o para reducir el crecimiento del tumor metastásico.

35 La eficacia del tratamiento con un anticuerpo o inmunoconjugado de acuerdo con la invención puede ensayarse fácilmente *in vivo*, por ejemplo en un modelo de ratón de cáncer, y midiendo, por ejemplo, cambios en el volumen tumoral entre los grupos tratado y de control, % de regresión tumoral, regresión parcial y/o regresión completa como se define en el Ejemplo 5.3.

#### Usos diagnósticos

40 Se ha dado a conocer que CEACAM5 se expresa altamente en la superficie de células de tumor colorrectal, gástrico, de pulmón, uterino, y se expresa débilmente en pocas células epiteliales normales tales como células epiteliales de colon y esófago. Además, el cribado de un panel de tumores humanos por inmunohistoquímica usando un anticuerpo de ratón anti-CEACAM5 humana de acuerdo con la invención mostró tinción de anticuerpo en cánceres colorrectal, de estómago, de pulmón, de cuello uterino, de páncreas, de esófago, de ovario, de tiroides, de vejiga, de endometrio, de mama, de hígado (en particular colangiocarcinoma), de próstata, y de piel.

45 Por lo tanto, CEACAM5 constituye un marcador canceroso y, por lo tanto, tiene el potencial de usarse para indicar la eficacia de una terapia anti-cancerosa o detectar la recurrencia de la enfermedad.

50 En una realización, el anticuerpo de la invención se usa como componente de un ensayo en el contexto de una terapia dirigida a tumores que expresan CEACAM5, con el fin de determinar la susceptibilidad del paciente al agente terapéutico, monitorizar la eficacia de la terapia anti-cancerosa, o detectar la recurrencia de la enfermedad después del tratamiento. En particular, el mismo anticuerpo de la invención se usa tanto como componente del agente terapéutico como componente del ensayo de diagnóstico.

Así, un objeto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso para detectar *in vivo* la expresión de CEACAM5 en un sujeto, o para uso para detectar *ex vivo* la expresión de CEACAM5 en la muestra biológica de un sujeto. Dicha detección puede estar destinada en particular para

55 a) diagnosticar la presencia de un cáncer en un sujeto, o

b) determinar la susceptibilidad de un paciente que tiene cáncer a un agente terapéutico dirigido a CEACAM5, en particular un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, o

5 c) monitorizar la eficacia de una terapia contra el cáncer anti-CEACAM5 o detectar la recaída de cáncer después de una terapia contra el cáncer anti-CEACAM5, en particular para terapia con un inmunoconjugado de acuerdo con la invención;

detectando la expresión de la proteína de superficie CEACAM5 en células tumorales.

10 En una realización, el anticuerpo está destinado para un uso *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, CEACAM5 puede detectarse *in vitro* o *ex vivo* en una muestra biológica obtenida de un sujeto, usando un anticuerpo de la invención. El uso de acuerdo con la invención también puede ser un uso *in vivo*. Por ejemplo, un anticuerpo de acuerdo con la invención se administra al sujeto y los complejos anticuerpo-células se detectan y/o cuantifican, con lo cual la detección de dichos complejos es indicativa de un cáncer.

La invención se refiere además a un método *in vitro* o *ex vivo* para detectar la presencia de un cáncer en un sujeto, que comprende las etapas que consisten en:

15 (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo de acuerdo con la invención, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica;

(b) medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,

(c) detectar la presencia de un cáncer comparando el nivel medido de anticuerpo unido con un control, siendo un nivel incrementado de anticuerpo unido comparado con el control indicativo de un cáncer.

20 La invención también se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para determinar la susceptibilidad de un paciente que tiene cáncer a un agente terapéutico dirigido a CEACAM5, en particular a un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, método que comprende las etapas que consisten en:

(a) poner en contacto una muestra biológica de un paciente que tiene cáncer con un anticuerpo de acuerdo con la invención, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica;

25 (b) medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,

(c) comparar el nivel medido de anticuerpo unido a dicha muestra biológica con el nivel de anticuerpo unido a un control;

en el que un nivel incrementado de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con control es indicativo de un paciente susceptible a un agente terapéutico dirigido a CEACAM5.

30 En los métodos anteriores, dicho control puede ser una muestra biológica normal, no cancerosa, del mismo tipo, o un valor de referencia que se determina como representativo del nivel de unión del anticuerpo en una muestra biológica normal del mismo tipo.

35 En una realización, los anticuerpos de la invención son útiles para diagnosticar un cáncer que expresa CEACAM5, tal como un cáncer colorrectal, de estómago, de pulmón, de cuello uterino, de páncreas, de esófago, de ovario, de tiroides, de vejiga, de endometrio, de mama, de hígado (en particular colangiocarcinoma), de próstata, o de piel.

La invención se refiere además a un método *in vitro* o *ex vivo* para monitorizar la eficacia de una terapia contra el cáncer anti-CEACAM5, que comprende las etapas que consisten en:

40 (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que está sometido a terapia contra el cáncer anti-CEACAM5 con un anticuerpo de acuerdo con la invención, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica;

(b) medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,

(c) comparar el nivel medido de anticuerpo unido con el nivel de anticuerpo unido a un control;

en el que un nivel disminuido de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de eficacia de dicha terapia contra el cáncer anti-CEACAM5.

45 En dicho método, un nivel incrementado de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de ineficacia de dicha terapia contra el cáncer anti-CEACAM5.

En una realización, dicho control es una muestra biológica del mismo tipo que la muestra biológica sometida a análisis, pero que se ha obtenido del sujeto previamente en el tiempo, durante el curso de la terapia contra el cáncer anti-CEACAM5.

La invención se refiere además a un método *in vitro* o *ex vivo* para detectar la recidiva del cáncer después de una terapia contra el cáncer anti-CEACAM5, que comprende las etapas que consisten en:

- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que ha completado una terapia contra el cáncer anti-CEACAM5 con un anticuerpo de acuerdo con la invención, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica;
- (b) medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,
- (c) comparar el nivel medido de anticuerpo unido con el nivel de anticuerpo unido a un control;

en el que un nivel incrementado de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de recidiva del cáncer después de la terapia contra el cáncer anti-CEACAM5.

- 10 Dicho control es en particular una muestra biológica del mismo tipo que la muestra biológica sometida a análisis, pero que se ha obtenido del sujeto previamente en el tiempo, durante o después de la finalización de la terapia contra el cáncer anti-CEACAM5.

- 15 Dicha terapia contra el cáncer anti-CEACAM5 es en particular una terapia que usa un anticuerpo o inmunocombinado de acuerdo con la invención. Dicha terapia contra el cáncer anti-CEACAM5 está dirigida a un cáncer que expresa CEACAM5, en particular un cáncer colorrectal, de estómago, de pulmón, de cuello uterino, de páncreas, de esófago, de ovario, de tiroides, de vejiga, de endometrio, de mama, de hígado (en particular colangiocarcinoma), de próstata, o de piel.

- 20 En una realización, los anticuerpos de la invención pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualesquiera otros marcadores conocidos en la técnica que proporcionen (bien directa o indirectamente) una señal.

- 25 Tal y como se usa en el presente documento, el término “marcado”, respecto al anticuerpo de acuerdo con la invención, pretende englobar el marcaje directo del anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, enlazamiento físico) de una sustancia detectable, tal como un agente radioactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) al polipéptido, así como el marcaje indirecto del polipéptido por reactividad con una sustancia detectable.

- 30 Un anticuerpo de la invención puede marcarse con una molécula radioactiva por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radioactivas incluyen, pero no están limitadas a, un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, tal como  $I^{123}$ ,  $I^{124}$ ,  $In^{111}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Tc^{99}$ . Los polipéptidos de la invención también pueden marcarse con un marcador de espín para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como formación de imágenes de resonancia magnética, MRI), tal como yodo-123, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

- 35 Una “muestra biológica” engloba una variedad de tipos de muestra obtenidos de un sujeto, y pueden usarse en un ensayo de diagnóstico o monitorización. Las muestras biológicas incluyen, pero no están limitadas a, sangre u otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tal como muestra de biopsia o cultivos de tejido o células derivados de ésta, y la progenie de éstas. Por lo tanto, las muestras biológicas engloban muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido, en particular muestra tumoral.

- 40 En una realización, la muestra biológica puede ser una muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE). De hecho, los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden usarse ventajosamente en tejidos de FFPE que es el formato usado por la mayor parte de los hospitales para recolectar y archivar muestras de tejido.

La invención también se refiere a un método *in vivo* para detectar la presencia de un cáncer en un sujeto, que comprende las etapas que consisten en:

- 45 a) administrar un anticuerpo de acuerdo con la invención marcado detectablemente a un paciente;
- b) detectar la localización de dicho anticuerpo marcado detectablemente en el paciente por formación de imágenes.

Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para determinar el estadio del cáncer (por ejemplo, en formación de radioimágenes). Pueden usarse solos o en combinación con otros marcadores cancerosos.

Los términos “detección” o “detectado”, tal y como se usan en el presente documento, incluyen la detección cualitativa y/o cuantitativa (medir los niveles) con o sin referencia a un control.

- 50 En el contexto de la invención, el término “diagnosticar”, tal y como se usa en el presente documento, significa la determinación de la naturaleza de una afección médica destinada a identificar una patología que afecta al sujeto a partir de varios datos recolectados.

En dicho método, el cáncer es un cáncer que expresa CEACAM5, en particular un cáncer colorrectal, de estómago, de pulmón, de cuello uterino, de páncreas, de esófago, de ovario, de tiroides, de vejiga, de endometrio, de mama, de hígado (en particular colangiocarcinoma), de próstata, o de piel.

Kits

- 5 Finalmente, la invención también proporciona kits que comprenden al menos un anticuerpo o inmunocombinado de la invención. Los kits que contienen anticuerpos de la invención encuentran uso en la detección de la proteína de superficie CEACAM5, o en ensayos terapéuticos o de diagnóstico. Los kits de la invención pueden contener un polipéptido o anticuerpo acoplado a un soporte sólido, por ejemplo una placa de cultivo tisular o perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contienen anticuerpos para la detección y cuantificación de la proteína de superficie CEACAM5 *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una transferencia Western. Dicho anticuerpo útil para la detección puede proporcionarse con un marcador tal como uno fluorescente o radiomarcador.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

- SEQ ID NO:1-4, y 6 muestran las secuencias de las CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L y CDR3-L del denominado anticuerpo "MAb1".
- 15 SEQ ID NO:5 muestra la secuencia de la variante de VH VH1a del anticuerpo MAb2 humanizado.
- SEQ ID NO:7-10, y 12 muestran las secuencias de las CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L y CDR3-L del denominado anticuerpo "MAb2".
- SEQ ID NO:11 muestra la secuencia de CEACAM1 humana según está disponible en GenBank NP\_001703,2.
- 20 SEQ ID NO:13-16, y 18 muestran las secuencias de las CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L y CDR3-L del denominado anticuerpo "MAb3".
- SEQ ID NO:17 muestra la secuencia de la variante de VL VL1 del anticuerpo MAb2 humanizado.
- SEQ ID NO:19-22, y 24 muestran las secuencias de las CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L y CDR3-L del denominado anticuerpo "MAb4".
- 25 SEQ ID NO:23 muestra la secuencia de la variante de VL VL1a del anticuerpo MAb2 humanizado.
- SEQ ID NO:25-28, y 30 muestran las secuencias de las CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L y CDR3-L del denominado anticuerpo "MAb5".
- SEQ ID NO:29 muestra la secuencia de la variante de VL VL1c del anticuerpo MAb2 humanizado.
- SEQ ID NO:31 muestra la secuencia de VH del anticuerpo "MAb1".
- 30 SEQ ID NO:32 muestra la secuencia de VL del anticuerpo "MAb1".
- SEQ ID NO:33 muestra la secuencia de VH del anticuerpo "MAb2".
- SEQ ID NO:34 muestra la secuencia de VL del anticuerpo "MAb2".
- SEQ ID NO:35 muestra la secuencia de VH del anticuerpo "MAb3".
- SEQ ID NO:36 muestra la secuencia de VL del anticuerpo "MAb3".
- 35 SEQ ID NO:37 muestra la secuencia de VH del anticuerpo "MAb4".
- SEQ ID NO:38 muestra la secuencia de VL del anticuerpo "MAb4".
- SEQ ID NO:39 muestra la secuencia de VH del anticuerpo "MAb5".
- SEQ ID NO:40 muestra la secuencia de VL del anticuerpo "MAb5".
- SEQ ID NO:41 muestra la secuencia de cadena pesada del anticuerpo chMAb1.
- 40 SEQ ID NO:42 muestra la secuencia de cadena ligera del anticuerpo chMAb1.
- SEQ ID NO:43 muestra la secuencia de cadena pesada del anticuerpo chMAb2.
- SEQ ID NO:44 muestra la secuencia de cadena ligera del anticuerpo chMAb2.
- SEQ ID NO:45 muestra la secuencia de cadena pesada del anticuerpo chMAb3.

- SEQ ID NO:46 muestra la secuencia de cadena ligera del anticuerpo chMAb3.
- SEQ ID NO:47 muestra la secuencia de cadena pesada del anticuerpo chMAb4.
- SEQ ID NO:48 muestra la secuencia de cadena ligera del anticuerpo chMAb4.
- SEQ ID NO:49 muestra la secuencia de cadena pesada del anticuerpo chMAb5.
- 5 SEQ ID NO:50 muestra la secuencia de cadena ligera del anticuerpo chMAb5.
- SEQ ID NO:51 muestra la secuencia de la variante de VH VH1 del anticuerpo MAb2 humanizado.
- SEQ ID NO:52 muestra la secuencia de CEACAM5 humana de longitud completa según está disponible en la base de datos GenBank con el número de registro AAA51967,1.
- SEQ ID NO:53 muestra la secuencia del dominio extracelular de CEACAM5 de *Macaca fascicularis*.
- 10 SEQ ID NO:54 muestra la secuencia de la cadena ligera de un anticuerpo quimérico (derivado del anticuerpo "MAb2") que comprende una mutación K52 a R52.
- SEQ ID NO:55 muestra la secuencia de la variante de VL VL1d del anticuerpo MAb2 humanizado.
- SEQ ID NO:56 muestra la secuencia del dominio extracelular de hCEACAM1 (posiciones 35-428 de hCEACAM1 de longitud completa (NP\_001703,2), seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His).
- 15 SEQ ID NO:57 muestra la secuencia del dominio extracelular de cCEACAM1, seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His.
- SEQ ID NO:58 muestra la secuencia del dominio extracelular de hCEACAM5 (posiciones 35-685 de hCEACAM5 de longitud completa (AAA51967,1), seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His).
- 20 SEQ ID NO:59 muestra la secuencia del dominio extracelular de cCEACAM5, seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His.
- SEQ ID NO:60 muestra la secuencia del dominio extracelular de hCEACAM6 (posiciones 35-327 de hCEACAM6 de longitud completa (NP\_002474,3), seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His).
- 25 SEQ ID NO:61 muestra la secuencia del dominio extracelular de cCEACAM6, seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His.
- SEQ ID NO:62 muestra la secuencia del dominio extracelular de hCEACAM8 (posiciones 35-332 de hCEACAM8 de longitud completa (NP\_001807,2), seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His).
- 30 SEQ ID NO:63 muestra la secuencia del dominio extracelular de cCEACAM8, seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His.
- SEQ ID NO:64 muestra la secuencia del dominio extracelular de hCEACAM7 (posiciones 36-248 de hCEACAM7 de longitud completa (NMP\_008821,1), seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His).
- 35 SEQ ID NO:65 muestra la secuencia de N-A1-B1 de hCEACAM5 (posiciones 35-320 de hCEACAM5 de longitud completa (AAA51967,1.)), seguido de 6 aminoácidos de la etiqueta de His.
- SEQ ID NO:66 muestra la secuencia de A2-B2 de hCEACAM5 (posiciones 321-498 de hCEACAM5 de longitud completa (AAA51967,1.)), seguido de 6 aminoácidos de la etiqueta de His.
- 40 SEQ ID NO:67 muestra la secuencia de A3-B3 de hCEACAM5 (posiciones 499-685 de hCEACAM5 de longitud completa (AAA51967,1.)), seguido de 6 aminoácidos de la etiqueta de His.
- SEQ ID NO:68 muestra la secuencia de N-A1-B1 de cCEACAM5, seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His.
- 45 SEQ ID NO:69 muestra la secuencia de A2-B2 de cCEACAM5, seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His.

- SEQ ID NO:70 muestra la secuencia de A3-B3 de cCEACAM5, seguido de una extensión de 24 aminoácidos que contiene una etiqueta de His.
- SEQ ID NO:71 muestra la secuencia de la proteína de longitud completa CEACAM6 humana según está disponible en GenBank NP\_002474,3.
- 5 SEQ ID NO:72 muestra la secuencia de la proteína de longitud completa CEACAM7 humana según está disponible en GenBank NP\_008821,1.
- SEQ ID NO:73 muestra la secuencia de la proteína de longitud completa CEACAM8 humana según está disponible en GenBank NP\_001807,2.
- SEQ ID NO:74 muestra la secuencia de VH del MAb2\_VLg5VHg2 humanizado variante.
- 10 SEQ ID NO:75 muestra la secuencia de VL del MAb2\_VLg5VHg2 humanizado variante.
- SEQ ID NO:76 muestra la secuencia de aminoácidos en las posiciones 109-115 de A3-B3 de CEACAM5 humana.
- SEQ ID NO: 77 muestra la secuencia de aminoácidos en las posiciones 131-143 de A3-B3 de CEACAM5 humana.
- 15 SEQ ID NO: 78 muestra una secuencia de consenso para CDR1-H de la familia de anticuerpos MAb2/MAb4/MAb5 basada en comparaciones de secuencias.
- SEQ ID NO:79 muestra una secuencia de consenso para CDR2-H de la familia de anticuerpos MAb2/MAb4/MAb5 basada en comparaciones de secuencias.
- 20 SEQ ID NO:80 muestra una secuencia de consenso para CDR3-H de la familia de anticuerpos MAb2/MAb4/MAb5 basada en comparaciones de secuencias.
- SEQ ID NO:81 muestra una secuencia de consenso para CDR1-H de la familia de anticuerpos de MAb1/MAb3.
- SEQ ID NO:82 muestra una secuencia de consenso para CDR2-H de la familia de anticuerpos de MAb1/MAb3.
- 25 SEQ ID NO:83 muestra una secuencia de consenso para CDR1-H de la familia de anticuerpos MAb2/MAb4/MAb5 basada en restos identificados como neutros en la unión de los dominios extracelulares de CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*.
- SEQ ID NO:84 muestra una secuencia de consenso para CDR3-H de la familia de anticuerpos MAb2/MAb4/MAb5 basada en restos identificados como neutros en la unión de los dominios extracelulares de CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*.
- 30 SEQ ID NO:85 muestra una secuencia de consenso para CDR1-L de la familia de anticuerpos MAb2/MAb4/MAb5 basada en restos identificados como neutros en la unión de los dominios extracelulares de CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*.
- SEQ ID NO:86 muestra una secuencia de consenso para CDR3-L de la familia de anticuerpos MAb2/MAb4/MAb5 basada en restos identificados como neutros en la unión de los dominios extracelulares de CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*.
- 35 SEQ ID NO:87 muestra la secuencia de cadena pesada de huMAb2-3 (MAb2\_VL1cVH1a-IgG1).
- SEQ ID NO:88 muestra la secuencia de cadena ligera de huMAb2-3 (MAb2\_VL1cVH1a-IgG1).
- SEQ ID NO:89 muestra la secuencia de cadena pesada de huMAb2-4 (MAb2\_VL1d VH1-IgG1).
- 40 SEQ ID NO:90 muestra la secuencia de cadena ligera de huMAb2-4 (MAb2\_VL1d VH1-IgG1).

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Evaluación de la selectividad de los anticuerpos anti-CEACAM5.

Figura 2: Cartografiado de los dominios de los anticuerpos anti-CEACAM5 en CEACAM5 humana.

Figura 3: Cartografiado de los dominios de los anticuerpos anti-CEACAM5 en CEACAM5 de mono macaco.

Figura 4: Evaluación de la actividad anti-tumoral de los conjugados chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4, y chMAb2-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de colon humano primario CR-IGR-034P en ratones hembra SCID.

5 Figura 5: Evaluación de la actividad anti-tumoral de los conjugados huMAb2-3-SPDB-DM4, huMAb2-4-SPDB-DM4 y chMAb2-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de colon humano primario CR-IGR-034P en ratones hembra SCID.

Figura 6: Evaluación de la actividad anti-tumoral del conjugado huMAb2-3-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de estómago humano primario STO-IND-006 en ratones hembra SCID.

10 Figura 7: Alineamientos de secuencia de las regiones VH y VL de los anticuerpos MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 y MAb5.

Figura 8: Análisis de HRMS del conjugado chMAb1-SPDB-DM4.

Figura 9: Análisis de HRMS del conjugado chMAb2-SPDB-DM4.

Figura 10: Análisis de HRMS del conjugado chMAb4-SPDB-DM4.

Figura 11: Análisis de HRMS del conjugado chMAb5-SPDB-DM4.

15 Figura 12: Análisis de HRMS del conjugado huMAb2-2-SPDB-DM4.

Figura 13: Análisis de HRMS del conjugado huMAb2-1-SPDB-DM4.

Figura 14: Análisis de HRMS del conjugado huMAb2-3-SPDB-DM4.

Figura 15: Análisis de HRMS del conjugado huMAb2-4-SPDB-DM4.

20 Figura 16: Actividad de unión de variantes humanizadas de MAb2 al dominio extracelular de CEACAM5 humana y de mono.

Figura 17: Estabilidad de la unión de variantes humanizadas de MAb2 al dominio extracelular de CEACAM5 humana y de mono.

Figura 18: Evaluación de la actividad anti-tumoral del conjugado huMAb2-3-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de pulmón humano primario LUN-NIC-0014 en ratones hembra SCID.

25 Figura 19: Evaluación de la actividad anti-tumoral de los conjugados huMAb2-3-SPDB-DM4 y huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de colon humano primario CR-IGR-034P en ratones hembra atímicos CD1.

Figura 20: Análisis de HRMS de huMAb2-3-sulfoSPDB-DM4.

Figura 21: análisis de HRMS de huMAb2-3-SMCC-DM1.

30 Figura 22: Alineamiento del dominio variable de cadena pesada de MAb2, MAb4, MAb5, VH1a humanizado, VH1 humanizado y VHg2 humanizado.

Figura 23: Alineamiento del dominio variable de cadena ligera de MAb2, MAb4, MAb5, VL1 humanizado, VL1a humanizado, VL1c humanizado, VL1d humanizado y VLg5 humanizado.

## EJEMPLOS

35 La presente invención se ilustra además mediante los ejemplos siguientes, que no deberían constituir una limitación adicional.

### Ejemplo 1: Preparación de dominios extracelulares recombinantes de proteínas CEACAM

40 En este ejemplo, los dominios proteicos extracelulares (ECD) de CEACAM de origen humano (h) o de mono macaco (c) se han preparado por expresión transitoria en células de riñón embrionario humano HEK293 con plásmidos que permiten la expresión del ADNc respectivo como se muestra en la Tabla 1.

Cada plásmido de expresión formó un complejo con 293fectin™ (Life Technologies) y se añadió a células 293-F cultivadas en suspensión (derivadas de células HEK293). Ocho días después de la transfección, los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron, y la proteína soluble correspondiente se purificó por IMAC (GE Healthcare) para generar un lote de proteína (véase la Tabla 1).

45

Tabla 1: Descripción de los dominios extracelulares recombinantes de proteínas CEACAM

Nombre de la proteína	Descripción de la proteína	Origen de la secuencia de ADNc	Identificador de la secuencia
hCEACAM1	ECD de CEACAM1 humana (35-428)	NP_001703.2	SEQ ID NO:56
cCEACAM1	ECD de CEACAM1 de <i>M. fascicularis</i> (35-428)	clonada internamente	SEQ ID NO:57
hCEACAM5	ECD de CEACAM5 humana (35-685)	AAA51967.1	SEQ ID NO:58
cCEACAM5	ECD de CEACAM5 de <i>M. fascicularis</i> (35-688)	clonada internamente	SEQ ID NO:59
hCEACAM6	ECD de CEACAM6 humana (35-327)	NP_002474.3	SEQ ID NO:60
cCEACAM6	ECD de CEACAM6 de <i>M. fascicularis</i> (35-327)	clonada internamente	SEQ ID NO:61
hCEACAM8	ECD de CEACAM8 humana (35-332)	NP_001807.2	SEQ ID NO:62
cCEACAM8	ECD de CEACAM8 de <i>M. fascicularis</i> (35-332)	clonada internamente	SEQ ID NO:63
hCEACAM7	ECD de CEACAM7 humana (36-248)	NP_008821.1	SEQ ID NO:64
hCEACAM5 NA1B1	dominio N-A1-B1 de CEACAM5 humana (35-320)	AAA51967.1	SEQ ID NO:65
hCEACAM5 A2B2	dominio A2-B2 de CEACAM5 humana (321-498)	AAA51967.1	SEQ ID NO:66
hCEACAM5 A3B3	dominio A3-B3 de CEACAM5 humana (499-685)	AAA51967.1	SEQ ID NO:67
cCEACAM5 NA1B1	dominio N-A1-B1 de CEACAM5 de <i>M. fascicularis</i> (35-320)	clonada internamente	SEQ ID NO:68
cCEACAM5 A2B2	dominio A2-B2 de CEACAM5 de <i>M. fascicularis</i> (321-498)	clonada internamente	SEQ ID NO:69
cCEACAM5 A3B3	dominio A3-B3 de CEACAM5 de <i>M. fascicularis</i> (499-688)	clonada internamente	SEQ ID NO:70

### Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales de ratón anti-CEACAM5

5 En este ejemplo, se han generado anticuerpos monoclonales después de inmunizar ratones de acuerdo con un protocolo que dio lugar a la generación de mAb anti-CEACAM5.

#### Ejemplo 2.1: Inmunización y generación de hibridomas

10 Las inmunizaciones, fusión y cribado se realizaron usando células de mieloma P3X63-Ag8,653 con el dominio extracelular de CEACAM5 humana, el dominio extracelular de CEACAM5 de macaco o con células tumorales humanas UMC11 como se describe en Wennerberg A.E et al., 1993. Am. J. Pathol., 143(4), 1050-1054 y Kilpatrick et al. 1997. Hybridoma 16: 381389.

15 Usando el método de RIMMS como se describe por Kilpatrick et al. (1997. Hybridoma 16: 381389), cada uno de ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad (S082342; Charles River Labs, Bar Harbor, ME) recibió cuatro ciclos de inmunización durante una tanda de tratamiento de 14 días a intervalos de 3-4 días. Los antígenos emulsionados en adyuvante de Titermax (TierMax Gold Adjuvant; Sigma #T2684) se administraron subcutáneamente en seis sitios próximos a los ganglios linfáticos de drenaje, a lo largo del lomo de los ratones, y en seis sitios yuxtapuestos a lo largo del abdomen. Cuatro días después de la última inyección, se sacrificaron los ratones. Se aislaron asépticamente ganglios linfáticos inguinales, axilares y branquiales, superficiales, popliteales, bilaterales, y se lavaron con medio RPMI fresco.

20 Usando el método clásico como se describe por Wennerberg A.E et al. (1993. Am. J. Pathol., 143(4), 1050-1054), cada uno de ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad ((S082342; Charles River Labs, Bar Harbor, ME) recibió tres ciclos de inmunización durante una tanda de tratamiento de 41 días. Los antígenos se administraron intraperitonealmente en el sitio ventral de los ratones. Tres días después de la última inyección, los ratones se sacrificaron, y los bazo se aislaron asépticamente y se lavaron con medio RPMI fresco.

25 Se liberaron linfocitos de los ganglios linfáticos o de los bazo, y la suspensión de una sola célula se lavó dos veces con medio RPMI antes de fusionarse con células de mieloma P3X63-AG8,653 usando polietilenglicol. Después de la fusión, la mezcla celular se incubó en una incubadora a 37°C durante 16-24 horas. La preparación de células resultante se transfirió a medio semisólido selectivo, y se colocó de manera aséptica en placas Petri de 100 mm y se incubó a 37°C. Diez días después del inicio de la selección, las placas se examinaron para determinar el crecimiento de los hibridomas, y las colonias visibles se recogieron y se colocaron en placas de 96 pocillos que contenían 200 µl de medio de crecimiento. Las placas de 96 pocillos se mantuvieron en una incubadora a 37°C durante 2 a 4 días.

30

**Ejemplo 2.2: Cribado y caracterización *in vitro* de anticuerpos murinos anti-CEACAM5**

El cribado primario para la producción de Ig anti-CEACAM5 se realizó por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) usando proteína CEACAM5 humana (preparada como se describe en el Ejemplo 1) como antígeno de captura, y con FACS usando varias células tumorales humanas (H460, MKN45, SW1463, SKMEL28 y UMC11).

5 Para el ensayo ELISA, las placas se revistieron con proteína CEACAM5 humana a 0,25 µg/pocillo en PBS, y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpos anti-CEACAM5 a la placa. La placa se incubó a 37°C durante 1 h y se lavó cinco veces con PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Después, se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución 1:50,000 de IgG de conejo anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma; #A9044).  
 10 Después de incubar a 37°C durante 1 h en la oscuridad, las placas se lavaron con PBS-T cinco veces. La unión del anticuerpo se visualizó añadiendo amortiguador de TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y leyendo a una longitud de onda de 450 nm. Para el ensayo FACS, se utilizaron células tumorales humanas a 40,000 células/pocillo para revestir una placa de 96 pocillos High Bind (MSD L15XB-3), y se añadieron 100 µl/pocillo de los anticuerpos anti-CEACAM5 durante 45 min. a 4°C y se lavó tres veces con PBS 1% BSA. Se añadieron 100 µl/pocillo de IgG anti-ratón de cabra conjugada con Alexa647 (Invitrogen; # A2135) durante 45 min. a 4°C, y se lavó tres veces con PBS 1% BSA. La unión del anticuerpo se evaluó después de centrifugar y resuspender las células añadiendo 200 µl/pocillo de PBS 1% BSA, y de leer usando el sistema de citometría de flujo Guava® easyCyte™ 8HT.

20 Para evaluar la especificidad por CEACAM5 de los anticuerpos anti-CEACAM5, se revistieron placas de 96 pocillos con proteínas recombinantes humanas CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 y CEACAM8 (preparadas como se describe en el Ejemplo 1) usando las mismas condiciones de revestimiento descritas previamente. Los anticuerpos anti-CEACAM5 se añadieron a las placas y se detectaron usando IgG anti-ratón de conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma; #A9044). La unión del anticuerpo se visualizó añadiendo amortiguador de TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y leyendo a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados presentados en la Figura 1 muestran que los anticuerpos anti-CEACAM5 son selectivos para CEACAM5 humana frente a CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 y CEACAM8 humanas.

**Ejemplo 2.3: Caracterización de la unión de mAb**

25 La afinidad aparente de los anticuerpos anti-CEACAM5 por hCEACAM5 expresada en la superficie de células tumorales humanas MKN45 (DSMZ, ACC 409) se determinó por el sistema de citometría de flujo Guava® easyCyte™ 8HT. Las células tumorales humanas MKN45 se utilizaron para revestir a 40,000 células/pocillo una placa de 96 pocillos High Bind (MSD L15XB-3), y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpos anti-CEACAM5 en diluciones seriadas de 2 veces empezando en 20 µg/ml hasta 12 diluciones en diluyente de ensayo durante 45 min. a 4°C, y se lavó tres veces con PBS 1% BSA. Se añadieron 100 µl/pocillo de IgG anti-ratón de cabra conjugada con Alexa647 (Invitrogen; # A2135) durante 45 min. a 4°C, y se lavó tres veces con PBS 1% BSA. La unión del anticuerpo se evaluó después de centrifugar y resuspender las células añadiendo 200 µl/pocillo de PBS 1% BSA y de leer usando el sistema de citometría de flujo Guava® easyCyte™ 8HT. Los valores de KD aparente y de CE50 se estimaron usando los software BIOST@T-BINDING y BIOST@T-SPEED, respectivamente.

35 Tabla 2: Valores de CE50 obtenidos en células MKN45

Anticuerpos	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
Valores de EC50	16 nM	3,4 nM	6,2 nM	4,9 nM	0,73 nM

40 El cartografiado de dominios de los anticuerpos anti-CEACAM5 contra las proteínas CEACAM5 humana y CEACAM5 de macaco se determinó por ELISA. Se revistieron placas de 96 pocillos con los dominios recombinantes humanos A1 (143-237), A1-B1 (143-320), A2-B2 (321-498) y A3-B3 (499-685) de la proteína CEACAM5 (preparados como se describe en el Ejemplo 1) y con los dominios recombinantes de macaco N-A1-B1 (1-320), A1-B1 (143-320), A2-B2 (321-498) y A3-B3 (499-688) de la proteína CEACAM5 (preparados como se describe en el Ejemplo 1) usando las mismas condiciones de revestimiento descritas previamente. Los anticuerpos purificados se añadieron a las placas y se detectaron usando IgG anti-ratón de conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma; #A9044). La unión del anticuerpo se visualizó añadiendo amortiguador de TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y leyendo a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se presentan en las Figuras 2 y 3, y muestran que los anticuerpos anti-CEACAM5 se unen al dominio A3-B3 de las proteínas CEACAM5 humana y de macaco.

Los isotipos de mAb individuales se determinaron usando un kit de isotipado de IgG de ratón de acuerdo con las instrucciones del fabricante (SEROTEC ref. MMT1). Los cinco mAb específicos de CEACAM5 fueron del isotipo IgG1, k.

**Ejemplo 3: Caracterización de los anticuerpos murinos anti-CEACAM5****50 Ejemplo 3.1: Caracterización *in vitro* de anticuerpos murinos anti-CEACAM5**

Se produjeron hibridomas de ratón que expresan Ab específicos de CEACAM5 en matraces T500, y el medio acondicionado se recolectó después de 7 días de crecimiento. Los Ab específicos de CEACAM5 se purificaron haciendo pasar el medio acondicionado a través de una columna de Proteína G, lavándolo y se eluyéndolo con

amortiguador de glicina/HCl 100 mM pH 2,7. El eluato se dializó frente a PBS antes de filtrarlo de forma esteril y almacenarlo a 4°C.

5 Todos los mAb específicos de CEACAM5 se evaluaron para determinar su capacidad para unirse a la proteína CEACAM5 humana y de primate por ELISA. Se revistieron las placas con proteína CEACAM5 humana o de primate, se añadieron mAb anti-hCEACAM5 a la placa, y se detectaron usando IgG anti-ratón de conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma; #A9044). La unión del anticuerpo se visualizó añadiendo amortiguador de TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y leyendo a una longitud de onda de 450 nm.

Tabla 3: Valores de CE50 correspondientes a la capacidad de unión de mAb específicos de CEACAM5 a proteínas CEACAM5 de primate

Anticuerpos	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
CE50 (nM) hCEACAM5	0,53	0,14	0,36	0,08	0,40
CE50 (nM) cCEACAM5	1,18	0,07	3,72	0,05	0,45
Relación c/h	2,2	0,5	10	0,6	1,1

10 **Ejemplo 3.2: Afinidad aparente y capacidad de unión del anticuerpo de anticuerpos anti-CEACAM5 a células tumorales de colon humano primario CR-IGR-034P por citometría de flujo**

15 El tumor de colon primario humano avanzado CR-IGR-034P (Julien et al., Clin Cancer Res October 1, 2012 18:5314-5328) se obtuvo de xenoinjerto derivado de paciente en ratones. El tumor CR-IGR-034P se disoció enzimáticamente usando colagenasa tipo IV (Invitrogen; #17104-019) y desoxirribonucleasa I (Invitrogen; #18047-019) durante 1 h a 4°C. La viabilidad celular se estimó por aplicación Viacount usando el sistema de citometría de flujo Guava® easyCyte™ 8HT. Para la estimación de la afinidad aparente, las células tumorales CR-IGR-034P se utilizaron para revestir a 40,000 células/pocillo una placa de 96 pocillos High Bind (MSD L15XB-3), y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpos anti-CEACAM5 en diluciones seriadas de 2 veces empezando en 20 µg/ml hasta 12 diluciones en diluyente de ensayo durante 45 min. a 4°C, y se lavó tres veces con PBS 1% BSA. Se añadieron 100 µl/pocillo de IgG anti-ratón de cabra conjugada con Alexa647 (Invitrogen; # A2135) o IgG anti-humana de cabra conjugada con Alexa488 (Invitrogen; # A11013) durante 45 min. a 4°C, y se lavó tres veces con PBS 1% BSA. La unión del anticuerpo se evaluó después de centrifugar y resuspender las células añadiendo 200 µl/pocillo de PBS 1% BSA, y de leer usando el sistema de citometría de flujo Guava® easyCyte™ 8HT. Los valores de KD aparente y CE50 se estimaron usando los software BIOST@T-BINDING y BIOST@T-SPEED, respectivamente.

25 La capacidad de unión del anticuerpo de los anticuerpos anti-CEACAM5 se determinó usando el kit calibrador de IgG de ratón (Biocytex #7208) o el kit calibrador de IgG humana (Biocytex #CP010) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 4: Valores de KD y de CE50 obtenidos en células de tumor de colon primario humano avanzado CR-IGR-034P

Anticuerpos	MAB1	MAB2	MAB3	MAB4	MAB5
Valor de KD	1,92 nM	0,38 nM	1,01 nM	0,16 nM	0,5 nM
Valor de CE50	1 nM	0,53 nM	2,8 nM	0,2 nM	1,4 nM

30 **Ejemplo 3.3: Actividad de internalización de los anticuerpos murinos específicos de CEACAM5**

35 Para evaluar la internalización de los anticuerpos anti-CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 y MAb5, se incubaron células MKN45 viables durante 24 h a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> (o 4°C en hielo para el control negativo) con 10 µg/ml de anticuerpos anti-CEACAM5 marcados previamente con AlexaFluor488. Después, una parte de los pocillos se enjuagó con medio de cultivo, y los anticuerpos extracelulares marcados con AF unidos a las células se paralizaron incubando las células con anticuerpo anti-AlexaFluor 488 (50 µg/ml) en hielo durante 30 min. (nivel de fluorescencia intracelular). La otra parte de los pocillos solo se incubó con medio de cultivo en la misma condición de tiempo (nivel de fluorescencia total).

40 Las células se despegaron y se lavaron entonces, y se recolectaron en medio de cultivo antes de análisis por citometría de flujo usando un analizador MACSQUANT Vyb. Se midió la fluorescencia asociada a las células de  $1 \times 10^4$  células, y se cuantificó la intensidad fluorescente media de las células viables agrupadas. La proporción de internalización (%) se define dividiendo la fluorescencia extinguida asociada a las células entre la fluorescencia total asociada a las células multiplicado por 100. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (SD).

Tabla 5: Internalización del anticuerpo murino anti-CEACAM5 a 24 h en la línea celular MKN45

Anticuerpo	Internalización 24h, 37°C/5%CO <sub>2</sub> % $\pm$ StD
MAB1	49,9 $\pm$ 5,1
MAB2	45,0 $\pm$ 5,5
MAB3	51,1 $\pm$ 3,5
MAB4	42,5 $\pm$ 6,7
MAB5	51,7 $\pm$ 3,1

Los cinco anticuerpos específicos de CEACAM5 experimentaron internalización después de la unión de CEACAM5 expresada en la membrana de la superficie celular, apoyando su uso en el campo de los inmunoconjugados de anticuerpo para dirigir citotoxicidad específicamente a las células cancerosas. Los anticuerpos anti-CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 y MAb5 mostraron internalización en la línea celular de cáncer humana MKN45 de 49,9%, 45%, 51,1%, 42,5%, 51,7%, respectivamente, después de 24 horas de incubación.

#### Ejemplo 3.4: Actividad citotóxica de los ADC murinos correspondientes en la línea celular MKN45

Los anticuerpos murinos se conjugaron con el fin de definir su actividad citotóxica *in vitro*. En un tubo de 15 ml, a temperatura ambiente (23°C), se introdujeron sucesivamente con agitación magnética mAb, amortiguador A/HEPES (4%), DMA (dimetilacetamida, 20% v/v), y después 6 equivalentes de enlazador de SPDB. Después de una noche a temperatura ambiente, se añadió DM4 (maitansinoide, 9,6 equivalentes) en disolución de DMA 15 mM, y se hizo reaccionar 5 horas. La mezcla de conjugación bruta se purifica en columnas Superdex 200pg 16/60 o G25 26/10 (PBS-Na pH 7,4/5% de NMP), se concentró en Amicon 15 a 5000 g, y se filtró en Millex 0,22 µm.

El efecto de los conjugados anti-CEACAM5 con maitansinoide se ensayó entonces con respecto a la viabilidad de las células tumorales usando el kit Cell Titer-Glo (Promega). Para hacer esto, se colocaron en placas de 96 pocillos células de cáncer gástrico humano MKN45 y se dejaron adherir durante 4 horas en una atmósfera a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Se añadieron diferentes concentraciones de conjugados de anti-CEACAM5 a las células sembradas. Las células se incubaron entonces durante 96 horas en la misma atmósfera. Entonces se añadió reactivo Cell Titer-Glo a los pocillos durante 10 min. a temperatura ambiente, y la señal luminiscente se midió usando un contador de placas EnVision (Perkin-Elmer).

Tabla 6: Actividades citotóxicas de ADC murinos específicos de CEACAM5 en la línea celular CEACAM5+ MKN45

Conjugado de anticuerpo fármaco	Actividad citotóxica CI <sub>50</sub> (nM)
MAb1-SPDB-DM4	0,89 ± 0,23
MAb2-SPDB-DM4	0,14 ± 0,01
MAb3-SPDB-DM4	0,53 ± 0,15
MAb4-SPDB-DM4	0,96 ± 0,02
MAb5-SPDB-DM4	0,24 ± 0,04

Los anticuerpos anti-CEACAM5 conjugados con maitansinoide (DM4), MAb1-SPDB-DM4, MAb2-SPDB-DM4, MAb3-SPDB-DM4, MAb4-SPDB-DM4 y MAb5-SPDB-DM4, mostraron actividades citotóxicas *in vitro* con una CI<sub>50</sub> de 0,89, 0,14, 0,53, 0,96 y 0,24 nM, respectivamente.

#### Ejemplo 4: Determinación de la secuencia de las cadenas pesadas y ligeras de los mAb anti-CEACAM5

Las secuencias de los dominios variables del mAb se recuperaron del hibridoma y se clonaron en un vector de expresión para asegurar que los mAb clonados tenían las mismas características que los mAb murinos iniciales.

Las secuencias de aminoácidos derivadas proporcionaron información de acuerdo con los datos obtenidos en mAb purificados derivados del hibridoma por secuenciación N-terminal y espectrometría de masas (LC/MS) de las cadenas pesada y ligera (LC, HC) (véase la Tabla 7).

Tabla 7: Análisis de espectrometría de masas de mAb anti-CEACAM5 de hibridoma

ID del clon	Cadena	Masa (Da)	
		mediante LC/MS a partir del lote	secuencia recuperada a partir del valor <i>in silico</i>
MAb1	LC	23837	23836
	HC (G0F)	50328	50330
MAb2i*	LC	23467	23467
	HC (G0F)	50288	50286
MAb3	LC	23907	23907
	HC (G0F)	50372	50373
MAb4	LC	23731	23731
	HC (G0F)	50370	50370
MAb5	LC	23659	23659
	HC (G0F)	50329	50330

\*: MAb2i es el anticuerpo producido por uno de los hibridomas clonados y del que se ha derivado el denominado "MAb2" introduciendo restos canónicos en las regiones del marco de VL y VH, como se explica en el ejemplo 5.

**Ejemplo 5: Conjugado de anticuerpo fármaco (ADC) (quimera)****Ejemplo 5.1: mAb quimera desnudo**

5 Las secuencias de ácido nucleico de los dominios variables VH, VL se clonaron en vectores de expresión en fusión con las secuencias codificantes del dominio constante de IgG1 humana o de Ckappa humana respectivamente para generar entonces lotes de mAb quimeras por expresión transitoria en HEK293 como se describe en el Ejemplo 1. Las afinidades por CEACAM5 humana y de macaco permanecieron similares para los mAb murinos y quimeras. En la Tabla 8, se ilustran las afinidades por la CE50 obtenida por ELISA con CEACAM5 humana o de macaco.

Tabla 8: CE50 obtenidas con CEACAM5 para hibridoma murino y mAb quimeras correspondientes

CE50 obtenida para los mAb de hibridomas murinos			CE50 obtenida para mAb quiméricos		
clon ID	hCEACAM5	cCEACAM5	clon ID	hCEACAM5	cCEACAM5
MAb1	0,53	1,18	chMAb1	0,51	1,57
MAb2i	0,14	0,07	chMAb2 (lote 1)	0,16	0,13
			chMAb2 (lote 2)	0,14	0,17
			chMAb2 <sub>K52R</sub>	0,11	0,15
MAb3	0,36	3,72	ch MAb3	No realizado	No realizado
MAb4	0,08	0,05	ch MAb4	0,14	0,12
MAb5	0,4	0,45	ch MAb5	0,18	0,13

10 Las secuencias para las regiones de CDR se dedujeron de la secuencia de proteínas usando la nomenclatura IMG. Corresponden a SEQ ID NO: 1-4, 6, 7-10, 12, 13-16, 18, 19-22, 24, 25-28, 30.

De forma importante, comparado con el anticuerpo producido por el hibridoma clonado (MAb2i), los restos canónicos se han introducido en el clon MAb2 en las posiciones 41G, 42K, y 45Q en VL, y en las posiciones 5Q y 7S en VH.

15 Además, la lisina en la posición 52 en el VL del clon MAb2 CEA-4 localizada en la CDR2 se ha reemplazado por arginina en el clon Mab2<sub>K52R</sub>. Se generó un lote en las mismas condiciones a las correspondientes al clon MAb2 y dio lugar a una afinidad similar por el dominio extracelular de CEACAM5 humana y de macaco como se muestra en la Tabla 7. Resaltó que esta mutación de punto en la CDR puede hacerse sin ningún impacto en la unión.

Las secuencias de LC y HC del mAb quimera para el clon MAb2 y el clon Mab2<sub>K52R</sub> corresponden a SEQ ID NO:43, 44, 54.

20 chMAb2 se construyó como se describe en el ejemplo 4. Es un mAb quimera derivado del clon MAb2 con una IgG1 humana, isotipo Ck. Las secuencias corresponden a SEQ ID NO:43 y 44. Se preparó un lote a escala de 300 mg por expresión transitoria en HEK293, seguido de una purificación en cromatografía de afinidad de proteínas; véase la Tabla 7 para los datos de unión. Fue el mAb desnudo usado para la producción del ADC.

**Ejemplo 5.2: Producción y caracterización de ADC**

25 En este ejemplo, se prepararon inmunoconjugados a partir de mAb quimera desnudo. Se evaluó entonces la eficacia *in vivo*.

Cálculo de DAR:

30 Un conjugado generalmente comprende de 1 a 10 molécula(s) del maitansinoide unido covalentemente al anticuerpo (denominado, "relación fármaco a anticuerpo" o "DAR"). Este número puede variar con la naturaleza del anticuerpo y del maitansinoide usado, junto con las condiciones experimentales usadas para la conjugación (como la relación maitansinoide/anticuerpo, el tiempo de reacción, la naturaleza del disolvente y del codisolvente, si se usa). Así, el contacto entre el anticuerpo y el maitansinoide da lugar a una mezcla que comprende varios conjugados que difieren entre sí por diferentes relaciones de fármaco a anticuerpo; opcionalmente el anticuerpo desnudo; opcionalmente agregados. El DAR que se determina es así un valor medio.

35 El método usado en el presente documento para determinar la DAR consiste en medir espectrofotométricamente la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm de una disolución del conjugado purificado sustancialmente. En particular, dicha DAR puede determinarse espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción medidos a respectivamente 280 y 252 nm para el anticuerpo y para el maitansinoide  $\epsilon_{D280} = 5,180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{D252} = 26,159 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . El método de cálculo se deriva de Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, vol 525, 445, Springer Science, y se describe con más detalle a continuación:

40

Las absorbancias para el conjugado a 252 nm (A252) y a 280 nm (A280) se miden o bien sobre el pico monomérico del análisis por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) (que permite calcular el parámetro "DAR(SEC)") o bien usando un aparato espectrofotométrico clásico (que permite calcular el parámetro "DAR(UV)"). Las absorbancias se pueden expresar como se indica a continuación:

$$A_{252} = (C_D \times \epsilon_{D252}) + (C_A \times \epsilon_{A252})$$

$$A_{280} = (C_D \times \epsilon_{D280}) + (C_A \times \epsilon_{A280})$$

en las que:

- $C_D$  y  $C_A$  son respectivamente las concentraciones en la disolución del maitansinoide y del anticuerpo
- 5 •  $\epsilon_{D252}$  y  $\epsilon_{D280}$  son respectivamente los coeficientes molares de extinción del maitansinoide a 252 nm y 280 nm
- $\epsilon_{A252}$  y  $\epsilon_{A280}$  son respectivamente los coeficientes molares de extinción del anticuerpo a 252 nm y 280 nm.

La resolución de estas dos ecuaciones con dos desconocidos conduce a las ecuaciones siguientes:

$$C_D = [(\epsilon_{A280} \times A_{252}) - (\epsilon_{A252} \times A_{280})] / [(\epsilon_{D252} \times \epsilon_{A280}) - (\epsilon_{A252} \times \epsilon_{D280})]$$

$$C_A = [A_{280} - (C_D \times \epsilon_{D280})] / \epsilon_{A280}$$

- 10 La DAR promedio se calcula entonces a partir de la relación de la concentración de fármaco a la del anticuerpo:  
DAR =  $C_D/C_A$ .

Desglicosilación y espectrometría de masas de alta resolución de los conjugados (HRMS)

- 15 La desglicosilación es una técnica de digestión enzimática mediante glicosidas. La desglicosilación se realiza a partir de 500  $\mu$ l de conjugado + 100  $\mu$ l de amortiguador Tris HCl 50 mM + 10  $\mu$ l de enzima glucanasa-F (100 unidades de enzima liofilizada/100  $\mu$ l de agua). El medio se sometió a vórtice y se mantuvo una noche a 37°C. La muestra desglicosilada está entonces lista para ser analizada en HRMS. Los espectros de masas se obtuvieron en un sistema Waters Q-ToF-2 en modo de electropulverización positiva (ES+). Las condiciones cromatográficas son las siguientes: columna: 4  $\mu$ m BioSuite 250 URH SEC 4,6 x 300 mm (Waters); disolventes: A: formiato de amonio 25 mM + 1% de ácido fórmico, B: CH<sub>3</sub>CN; temperatura de la columna: 30°C; caudal 0,4 ml/min.; elución isocrática 70% de A + 30% de B (15 min).
- 20

Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC)

- Columna: Columna TSKgel G3000 SWXL 5  $\mu$ m, 7,8 mm x 30 cm, TOSOH BIOSCIENCE, LLC nº de pieza 08541 + columna de guarda TSK-GEL SWXL 7  $\mu$ M, 40 mm x 6mm, TOSOH BIOSCIENCE, LLC nº de pieza 08543
- 25 - Fase Móvil: KCl (0,2M), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,052 M), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,107 M), iPrOH (20% en volumen)
- Condiciones de análisis: elución isocrática a 0,5 ml/min. durante 30 min.
- Análisis realizado en un sistema HPLC Lachrom Elite (Merck) usando un detector espectrofotométrico con DAD L2455.

Contenidos de amortiguadores

- 30 - Amortiguador A (pH 6,5): NaCl (50 mM), amortiguador de fosfato de potasio (50 mM), EDTA (2 mM)
- Amortiguador HGS (pH 5,5): histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa al 5% (p/v), HCl (8 mM)

Abreviaturas usadas

- 35 CV: Volumen de la columna; DAR: Relación de fármaco a anticuerpo; DMA: dimetilacetamida; HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico; HRMS: espectroscopía de masas de alta resolución; NHS: N-hidroxisuccinimida; Nitro-SPDB: éster 4-[(5-nitro-2-piridinil)ditio]-2,5-dioxo-1-pirrolidinílico del ácido butanoico (puede prepararse como se describe en la patente WO2004016801); NMP: N-metilpirrolidinona; RT: temperatura ambiente; SEC: cromatografía de exclusión por tamaño

ADC (quimeras):

chMAb1-SPDB-DM4

- 40 Datos analíticos:

$$MW(\text{Ab}) = 148438 \text{ g/mol}; MW(\text{DM4}) = 780,38 \text{ g/mol}$$

$$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 213320; \epsilon_{252\text{nm}}(\text{Ab}) = 73473$$

$$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 5180 \text{ y } \epsilon_{252\text{nm}}(\text{DM4}) = 26159$$

Con agitación, a RT, se introducen 3,59 ml de chMAb1 (C = 5,72 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 0,312 ml de DMA y 0,046 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (5,0 eq – disolución 15 mM en DMA). La disolución se somete a vórtice durante 30 segundos, y después se agita lentamente a RT durante 3 horas. Con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 3,8 ml de amortiguador de PBS pH 7,5, 0,389 ml de DMA y 0,074 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 2,5 horas a RT, la mezcla de reacción bruta se purifica en una columna desaladora HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), precondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de amortiguador de PBS pH 7,4 que contiene 5% de NMP en volumen. El conjugado se eluye con amortiguador de PBS pH 7,4 que contiene 5% de NMP, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan, se concentran en Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore), y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Se obtienen así 7,6 ml de conjugado chMAb1-SPDB-DM4 (c = 2,19 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV)= 3,38; DAR (SEC)= 3,34; RT = 17,54 min.; pureza monomérica = 99,8%.

El resultado del análisis de HRMS se muestra en la Figura 8.

#### 15 chMAb2-SPDB-DM4

Datos analíticos:

$$\text{MW}(\text{Ab}) = 147900 \text{ g/mol}; \text{MW}(\text{DM4}) = 780,38 \text{ g/mol}$$

$$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 201400; \epsilon_{252\text{nm}}(\text{Ab}) = 70889$$

$$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 5180 \text{ y } \epsilon_{252\text{nm}}(\text{DM4}) = 26159$$

20 Con agitación, a RT, se introducen 3,8 ml de chMAb2 (C = 5,08 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 0,337 ml de DMA y 0,0433 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (5,0 eq - disolución 15 mM en DMA). La disolución se somete a vórtice durante 30 segundos, y después se agita lentamente a RT durante 3 horas. Con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 3,12 ml de amortiguador de PBS pH 7,5, 0,319 ml de DMA y 0,069 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 2 horas a RT, la mezcla de reacción bruta se filtra en un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se purifica en una columna desaladora HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), precondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de amortiguador de PBS pH 7,4 que contiene 5% de NMP en volumen. El conjugado se eluye con amortiguador de PBS pH 7,4 que contiene 5% de NMP, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan, se concentran en Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore), y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

30 Se obtienen así 7,5 ml de conjugado chMAb2-SPDB-DM4 (c = 1,8 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 4,10; DAR (SEC) = 4,05; RT = 17,52 min.; pureza monomérica = 99,9%.

El resultado del análisis de HRMS se muestra en la Figura 9.

#### chMAb4-SPDB-DM4

35 Datos analíticos:

$$\text{MW}(\text{Ab}) = 148124 \text{ g/mol}; \text{MW}(\text{DM4}) = 780,38 \text{ g/mol}$$

$$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 204380; \epsilon_{252\text{nm}}(\text{Ab}) = 73142$$

$$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 5180 \text{ y } \epsilon_{252\text{nm}}(\text{DM4}) = 26159$$

40 Con agitación, a RT, se introducen 3,63 ml de chMAb4 (C = 5,69 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 0,316 ml de DMA y 0,0465 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (5,0 eq - disolución 15mM en DMA). La disolución se somete a vórtice durante 30 segundos, y entonces se agita lentamente a RT durante 3 horas. Con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 3,8 ml de amortiguador de PBS pH 7,5, 0,389 ml de DMA y 0,074 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 2 horas a RT, la mezcla de reacción bruta se purifica en una columna desaladora HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), precondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de amortiguador de PBS pH 7,4 que contiene 5% de NMP en volumen. El conjugado se eluye con amortiguador de PBS pH 7,4 que contiene 5% de NMP, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan, se concentran en Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore), y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

50 Se obtienen así 6,5 ml de conjugado chMAb4-SPDB-DM4 (c = 2,20 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 3,87; DAR (SEC) = 3,85; RT = 17,52 min.; pureza monomérica = 99,8%.

El resultado del análisis de HRMS se muestra en la Figura 10.

chMAb5-SPDB-DM4

Datos analíticos:

MW(Ab) = 148040 g/mol; MW(DM4) = 780,38 g/mol

5  $\epsilon_{280\text{nm}} 280\text{nm}(\text{Ab}) = 207360$ ;  $\epsilon_{280\text{nm}} 252\text{nm}(\text{Ab}) = 72288$

$\epsilon_{280\text{nm}} 280\text{nm}(\text{DM4}) = 5180$  y  $\epsilon_{280\text{nm}} 252\text{nm}(\text{DM4}) = 26159$

10 Con agitación, a RT, se introducen 3,15 ml de chMAb5 (C = 6,38 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 0,269 ml de DMA y 0,0453 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (5,0 eq - disolución 15 mM en DMA). La disolución se somete a vórtice durante 30 segundos, y entonces se agita lentamente a RT durante 3 horas. Con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 4,1 ml de amortiguador de PBS pH 7,5, 0,317 ml de DMA y 0,072 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 2 horas a RT, la mezcla de reacción bruta se filtra en un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se purifica en una columna desaladora HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), precondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de amortiguador de PBS pH 7,4 que contiene 5% de NMP en volumen. El conjugado se eluye con amortiguador de PBS pH 7,4 que contiene 5% de NMP, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan, se concentran en Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

15 Se obtienen así 7,5 ml de conjugado AntiCEACAM5\_hyb\_1917CEA4\_VH5Q7S\_VL41G42K45Q\_IgG1-SPDB-DM4 (c = 3,4 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 3,4; DAR (SEC) = 3,4; RT = 17,49 min.; pureza monomérica = 99,8%.

20

El resultado del análisis de HRMS se muestra en la Figura 11.

### Ejemplo 5.3: Eficacia *in vivo*

25 Los cuatro conjugados quiméricos (chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 y chMAb2-SPDB-DM4) se evaluaron a 2 dosis frente a tumores medibles de colon primario CR-IGR-034P implantados s.c. en ratones hembra SCID. Los grupos de control se dejaron sin tratar. Las dosis de los conjugados se proporcionaron en mg/kg. Se administraron a 5 y 2,5 por una inyección de bolo intravenosa (IV) en el día 14 después del implante del tumor.

30 Para la evaluación de la actividad anti-tumoral de los conjugados, los animales se pesaron diariamente, y los tumores se midieron 2 veces a la semana con un calibre. Una dosificación que producía un 20% de pérdida de peso corporal en el punto más bajo (media del grupo) o 10% o más muertes relacionadas con el fármaco se consideró una dosificación excesivamente tóxica. Los pesos corporales de los animales incluían los pesos de los tumores. Los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula masa ( $\text{mm}^3$ ) = [longitud (mm) x anchura (mm)<sup>2</sup>]/2. Los criterios primarios de valoración de la eficacia son  $\Delta T/\Delta C$ , mediana del porcentaje de regresión, y regresiones parcial y completa (PR y CR).

35 Los cambios del volumen tumoral para cada animal tratado (T) y de control (C) se calculan para cada tumor restando el volumen tumoral en el día del primer tratamiento (día de estadificación) del volumen tumoral en el día de observación especificado. El  $\Delta T$  mediano se calcula para el grupo tratado, y el  $\Delta C$  mediano se calcula para el grupo de control. A continuación se calcula la relación  $\Delta T/\Delta C$  y se expresa como un porcentaje:  $\Delta T/\Delta C = (\text{delta T}/\text{delta C}) \times 100$ .

40 La dosis se considera como terapéuticamente activa cuando  $\Delta T/\Delta C$  es menor de 40%, y muy activa cuando  $\Delta T/\Delta C$  es menor de 10%. Si  $\Delta T/\Delta C$  es menor de 0, la dosis se considera como altamente activa y se data el porcentaje de regresión (Plowman J, Dykes DJ, Hollingshead M, Simpson-Herren L y Alley MC. Human tumor xenograft models in NCI drug development. En: Feibig HH BA, editor. Basel: Karger.; 1999 p 101-125):

45 % de regresión tumoral se define como el % de disminución del volumen tumoral en el grupo tratado en un día de observación especificado comparado con su volumen en el primer día del primer tratamiento.

El % de regresión se calcula en un tiempo de medición específico y para cada animal. Después se calcula el % de regresión mediano para el grupo:

$$\% \text{ de regresión (a t)} = \frac{\text{volumen}_{t_0} - \text{volumen}_t}{\text{volumen}_{t_0}} \times 100$$

Regresión parcial (PR): Las regresiones se definen como parciales si el volumen tumoral disminuye al 50% del volumen tumoral al comienzo del tratamiento.

Regresión completa (CR): La regresión completa se logra cuando el volumen tumoral = 0 mm<sup>3</sup> (CR se considera cuando el volumen tumoral no se puede registrar).

5 Resultados:

Los resultados se presentan en la Figura 4 y en la Tabla 9 (más adelante). Usando un esquema de una única administración a 2,5 y 5 mg/kg, ninguno de los conjugados ensayados en este estudio indujo toxicidad.

10 chMAb1-SPDB-DM4 fue muy activo a 5 y 2,5 mg/kg con una  $\Delta T/\Delta C$  de 0 y 7% ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0170$  frente al control), respectivamente. chMAb4-SPDB-DM4 y chMAb5-SPDB-DM4 fueron altamente activos a 5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de -5 y -7% ( $p < 0,0001$  frente al control), respectivamente, y regresión tumoral de 25 y 65%, respectivamente. Fueron muy activos a 2,5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 7 y 2% ( $p = 0,0152$  y  $p = 0,0020$  frente al control), respectivamente. chMAb2-SPDB-DM4 fue altamente activo a 5 y 2,5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de -10 y -8% ( $p < 0,0001$  frente al control), respectivamente, regresión tumoral de 82 y 39%, respectivamente, y 3 y 1 CR/6, respectivamente.

15 A partir de estos resultados, todos los conjugados quiméricos chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 y chMAb2-SPDB-DM4 fueron usables para desarrollar un ADC terapéutico.

Tabla 9: Evaluación de la actividad anti-tumoral de los conjugados chMAb1-SPDB-DM4, chMAb2-SPDB-DM4, chMAb4-SPDB-DM4, y chMAb5-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de colon humano primario CR-IGR-034P en ratones hembra SCID.

Agente <sup>1</sup>	Ruta/ Dosis en ml/kg	Dosis en mg/kg por inyección	Calendario en días	Muerte por fármaco (Día)	Cambio promedio de peso corporal en % por ratón en el nadir (día de nadir)	ΔT/ΔC mediano en % (día)	% mediano de regresión (día)	Regresiones		Valor de p bioestadístico <sup>2</sup>	Comentarios
								Parcial	Completa		
chMAb1- SPDB- DM4	IV (10 ml/Kg)	5	14	0/6	-0,3 (D23)	0 (D33)	-	2/6	0/6	<0,0001	Muy activo
		2,5	14	0/6	-1,2 (D22)	7 (D21)	-	0/6	0/6	=0,0170	Muy activo
chMAb2- SPDB- DM4	IV (10 ml/Kg)	5	14	0/6	-1,1 (D29)	-10 (D33)	82 (D33)	6/6	3/6	<0,0001	Altamente activo
		2,5	14	0/6	-1,3 (D57)	-8 (D28)	39 (D28)	2/6	1/6	<0,0001	Altamente activo
ch MAb4- SPDB- DM4	IV (10 ml/Kg)	5	14	0/6	-1,9 (D22)	-5 (D28)	25 (D28)	2/6	0/6	<0,0001	Altamente activo
		2,5	14	0/6	-1,8 (D21)	7 (D25)	-	0/6	0/6	=0,0152	Muy activo
chMAb5- SPDB- DM4	IV (10 ml/Kg)	5	14	0/6	-1,8 (D29)	-7 (D33)	65 (D33)	4/6	0/6	<0,0001	Altamente activo
		2,5	14	0/6	-0,8 (D23)	2 (D21)	-	0/6	0/6	=0,0020	Muy activo
Control	-	-	14	-	-3,6 (D29)	-	-	-	-	-	-

1: formulación del fármaco: HGS (histidina 10 mM, glicina 130 mM, sacarosa al 5% v/v, Tween 80 al 0,01%) pH 7,4

2: Valor de p: Prueba de Dunnett frente a control después de Anova de 2 vías con medidas repetidas sobre cambios transformados en rangos de volumen tumoral desde la línea base.

**Ejemplo 6: Humanización del mAb anti-CEACAM5\_MAb2**

En este ejemplo, se han diseñado *in silico* variantes humanizadas de IgG MAb2 murino parental. Los mAb resultantes se produjeron y proporcionaron características similares al IgG ch-MAb2 quimérico.

**5 Ejemplo 6.1: Protocolo de humanización 4D****a) Humanización basada en trayectorias moleculares dinámicas**

Las secuencias de VL y VH del clon MAb2 murino se compararon frente a la base de datos de proteínas (PDB) (Berman et al., Nucleic Acids Research, 2000, 28:235-242). Se usaron los moldes siguientes: marco de la cadena ligera y pesada - 3EHB (90,9% de identidad de cadena ligera del marco y 90,8% de identidad de cadena pesada del marco), L1-118M, L2 - 1 F6L, L3 - 1 P7K, H1 - 2QHR, H2 - 1IGT y H3 - 1 P4B para construir un modelo de homología de anti-CEACAM5 LC y HC usando Molecular Operating Environment (MOE) (v. 2011.10 - Chemical Computing Group, Quebec, Canadá). Posteriormente, el modelo de homología se minimizó en energía usando los procedimientos estándar implementados en MOE.

Posteriormente, se realizó una simulación de dinámicas moleculares (MD) del modelo de homología 3D minimizado del MAb2 murino, con restricciones en la cadena principal proteica a 500 K de temperatura durante 1,1 nanosegundos (ns) en disolvente implícito de Born generalizado. Se extrajeron 10 conformaciones diversas de este primer ciclo de MD cada 100 picosegundos (ps) para el último 1 ns. Cada una de estas diversas conformaciones se sometió entonces a una simulación de MD, sin restricciones en la cadena principal proteica y a 300 K de temperatura durante 2,3 ns. Para cada uno de los 10 ciclos de MD, las últimas 2000 imágenes, una cada ps, de la trayectoria de MD se usaron entonces para calcular, para cada aminoácido de MAb2 murino, sus desviaciones cuadráticas medias (rmsd) comparado con una posición mediodiurna de referencia. Comparando la rmsd promedio en los 10 ciclos de MD separados de un aminoácido dado con la rmsd promedio global de todos los aminoácidos murinos de MAb2, se decide si el aminoácido es lo suficientemente flexible, como se observa durante la MD, para considerarse que probablemente interacciona con los receptores de las células T y que es responsable de la activación de la respuesta inmune. Se identificaron 32 aminoácidos como flexibles en el anticuerpo MAb2 murino, excluyendo la CDR y sus alrededores inmediatos a 5 Å.

El movimiento de los 60 aminoácidos más flexibles de MAb2 murino, durante los 20 ns (10 x 2 ns) de simulación de dinámica molecular, se comparó después con el movimiento de los aminoácidos flexibles correspondientes de 49 modelos de homología 3D humanos, para cada uno de los cuales se realizaron las mismas simulaciones de MD. Estos 49 modelos de línea germinal humana se han construido combinando sistemáticamente un panel representativo de 7 cadenas ligeras humanas (concretamente vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) con un panel representativo de 7 cadenas pesadas humanas (concretamente vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nucleic Acid Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

La combinación vk1-vh6 mostró la similitud más alta (72,6%) 4D de sus aminoácidos flexibles comparado con los aminoácidos flexibles del anticuerpo MAb2 murino; este modelo se usó por lo tanto para humanizar el anticuerpo MAb2 centrándose en los aminoácidos flexibles. Para la asociación de aminoácidos por parejas entre los aminoácidos de MAb2 murino y vk1-vh6, las 2 secuencias se alinearon basándose en la superposición 3D óptima de los carbonos alfa de los 2 modelos de homología correspondientes.

**b) Mutaciones estabilizadoras**

Para mejorar la estabilidad de las regiones VL y VH del anticuerpo anti-CEACAM5, se propone originalmente que los aminoácidos de las cadenas ligera y pesada con baja frecuencia de aparición frente a sus secuencias canónicas respectivas, excluyendo las CDR, estén mutados en los aminoácidos encontrados más frecuentemente ( $\Delta\Delta G_{th} > 0,5$  kcal/mol; (Monsellier et al. J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593). Una primera lista de mutaciones de consenso para la LC y para la HC se ha restringido a los aminoácidos encontrados en el modelo humano más cercano (es decir, vk1-vh6). Ninguna de estas mutaciones está localizada en la zona "Vernier" (Foote et al., J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499). Se tienen en cuenta otros criterios para considerar estas mutaciones de consenso para estabilizar potencialmente el anticuerpo MAb2 anti-CEACAM5. Estos criterios son un cambio favorable de hidropatía en la superficie, o una estabilización predicha del mutante basado en mecánicas moleculares. Se consideraron las mutaciones estabilizadoras indicadas como exitosas en la bibliografía (Bedouelle, H. J. Mol. Biol. 2006, 362, 580-593; Steipe B. J. Mol. Biol. 1994, 240, 188-192).

**c) Eliminación de motivos de secuencias no deseados**

Se consideraron los siguientes motivos de secuencias: Asp-Pro (enlace lábil a ácidos), Asn-X-Ser/Thr (glicosilación, X = cualquier aminoácido salvo Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (formación de succinimida/iso-asp en áreas flexibles), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (sitios de desamidación expuestos), Met (oxidación en área expuesta). Las secuencias humanizadas resultantes se analizaron por blast en busca de la similitud de secuencias frente a la base de datos

Immune Epitope Data Base (IEDB) database ((PLos Biol (2005) 3(3)e91) <http://www.immuneepitope.org>) para asegurar que ninguna de las secuencias contenía ningún epítipo conocido de células B o T listado.

d) Regiones VH y VL humanizadas

5 Se proponen tres versiones para la cadena ligera (VL1, VL1a, y VL1c) y tres versiones para la cadena pesada (VH1, VH1a y VH1b). La combinación particular de restos de aminoácidos alterados en cada variante de VL y VH de MAb2 humanizado se muestra en la Tabla 10 y en la Tabla 11, respectivamente. Las secuencias completas de aminoácidos de los dominios VH y VL humanizados se muestran en la Tabla 12.

La variante VL1 presenta 5 mutaciones que derivan de la comparación directa entre los aminoácidos más flexibles no de CDR de la cadena ligera de MAb2 anti-CEACAM5 y la secuencia de cadena ligera humana de vk1.

10 La variante VL1a deriva de VL1 e incluye 4 nuevas mutaciones que son de consenso (secuencia vk1) y potencialmente estabilizadoras. Además, 1 de estas mutaciones plantea un sitio de desamidación potencialmente problemático (D<sub>17</sub>T<sub>18</sub>).

La variante VL1c deriva de VL1a con la introducción de 1 mutación R en lugar de K en la posición 52. De hecho, este K52 está localizado en la CDR L2 y podría ser una "diana" para el proceso de conjugación.

15 La variante VH1 presenta 7 mutaciones que derivan de la comparación directa entre los aminoácidos más flexibles no de CDR de la cadena pesada de anti-CEACAM5 y la secuencia de cadena pesada humana de vh6.

La variante VH1a deriva de VH1 e incluye 4 nuevas mutaciones que son de consenso (secuencia vh6) y potencialmente estabilizadoras.

20 Los dominios VL y VH humanizados del anticuerpo MAb2 anti-CEACAM5 se combinaron como sigue: VL1 y VH1; VL1a y VH1a; VL1c y VH1a; VL1a y VH1b.

Tabla 10: Mutaciones de las variantes VL del anticuerpo MAb2 anti-CEACAM5

VL de MAb2 de ratón	VL1	VL1 d	VL1 a	VL1 c
E17	D	D	D	D
T18			R	R
Q40	P	P	P	P
Q45	K	K	K	K
K52		R		R
Q70			D	D
K74	T	T	T	T
N76	S	S	S	S
G84			A	A
S85			T	T

Tabla 11: Mutaciones de las variantes VH del anticuerpo MAb2 anti-CEACAM5

VH de MAb2 de ratón	VH1	VH1a
G9	P	P
V10	G	G
K19	S	S
K43	R	R
R44		G
F60		A
D62	S	S
Q65	K	K
N84		
K87	T	T
I89		V
A113		S

Tabla 12: Secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos anti-CEACAM5 humanizados ejemplares.

Variante VH o VL	Secuencia	SEQ ID NO.
clon MAb2 VH1	EVQLQESGPGGLVKPGGSLSLSCAASGFVFS SYDMSWVRQTPERRLEWVAYISSGGGITYF PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSED TAIYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLVTVSA	SEQ ID NO:51
clon MAb2 VH1a	EVQLQESGPGGLVKPGGSLSLSCAASGFVFS SYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYA PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSED TAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLVTVSS	SEQ ID NO:5
clon MAb2 VL1	DIQMTQSPASLSASVGDVITITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTKTLAEGVPS RFGSGSGTQFSLTISSLQPEDFGSYQCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:17
clon MAb2 VL1a	DIQMTQSPASLSASVGDVITITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTKTLAEGVPS RFGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:23
clon MAb2 VL1c	DIQMTQSPASLSASVGDVITITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTKTLAEGVPS RFGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:29
clon MAb2 VL1d	DIQMTQSPASLSASVGDVITITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTKTLAEGVPS RFGSGSGTQFSLTISSLQPEDFGSYQCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:55

**Ejemplo 6.2: Secuencia de mAb anti-CEACAM5 humanizado**

5 A partir de las secuencias de aminoácidos de las variantes VL y VH *in silico*, se derivaron las secuencias de ácido nucleico y se sintetizaron por Geneart. Las secuencias se clonaron en vectores de expresión fusionadas con las secuencias codificantes del dominio constante de IgG1 humana o de Ckappa humana, respectivamente.

**Ejemplo 6.3: Producción y caracterización *in vitro***

10 Se produjeron lotes de mAb humanizados por expresión transitoria en HEK293 y se purificaron por cromatografía de afinidad en proteína A. La estructura e identidad se confirmaron por análisis por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaños y espectrometría de masas.

La afinidad por CEACAM5 humana y de macaco se verificó por ELISA; las CE50 se proporcionan en la Tabla 13.

Tabla 13: Afinidad de mAb anti-CEACAM5 humanizado por CEACAM5 humana y de macaco

código	mAb	CEACAM5 humana		CEACAM5 de macaco	
		CE50 (nM)	CV	CE50 (nM)	CV
huMAb2-1	MAb2VL1VH1-IgG1	0,22	4,7%	0,20	7,9%
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	0,20	9,2%	0,17	5,0%
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	0,18	11%	0,19	4,3%
huMAb2-4	MAb2_VL1dVH1-IgG1	0,22	4,3%	0,17	5,0%
ch MAb2	MAb2-IgG1	0,16	9,9%	0,17	3,0%

15 La especificidad por CEACAM5 humana frente a CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 y CEACAM8 humanas se verificó por ELISA. Se dio a conocer como el porcentaje de unión comparado con la unión completa con CEACAM5 humana; véase la Tabla 14.

Tabla 14: Porcentaje de unión de mAb anti-CEACAM5 humanizado a CEACAM humanas

código	mAb	hCEA				
		CAM5	CAM1	CAM6	CAM7	CAM8
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	100%	0,3%	0,2%	0,3%	0,9%
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	100%	0,3%	0,3%	0,3%	0,5%
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	100%	0,2%	0,3%	0,3%	0,6%
huMAb2-4	MAb2_VL1dVH1-IgG1	100%	0,3%	0,3%	0,3%	1,4%
ch MAb2	MAb2-IgG1	100%	0,3%	0,3%	0,3%	0,6%

El dominio de unión al epítipo se verificó por ELISA, y se mostró que las variantes humanizadas reconocían el dominio A3-B3 específicamente. Se dio a conocer como el porcentaje de unión comparado con la unión completa con CEACAM5 humana en la Tabla 15.

Tabla 15: Porcentaje de unión de mAb anti-CEACAM5 humanizado a dominios de CEACAM5 humana

código	mAb	hCEACAM5		
		N-ter-A1-B1	A2-B2	A3-B3
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	0,4%	0,3%	100%
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	0,4%	0,3%	100%
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	0,4%	0,4%	100%
huMAb2-4	MAb2_VL1d_VH1-IgG1	0,3%	0,3%	100%
ch MAb2	MAb2-IgG1	0,5%	0,3%	100%

Las cinéticas de unión de las variantes de MAb2 anti-CEACAM5 humanizadas, comparadas con MAb2 quimérico, a CEACAM5 humana recombinante (hCEACAM5) y a CEACAM5 de mono macaco (cCEACAM5) se determinaron por un ensayo de resonancia de plasmones superficiales usando un BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ).

Brevemente, un chip biosensor de BIAcore CM5 se acopló en el instrumento y se activó con 70 µl de NHS/EDC 1:1 a temperatura ambiente. Se inmovilizó una IgG1 de ratón anti-Fc humano (BIAcore #BR-1008-39) (50 µg/mL en amortiguador de acetato 1M, pH 5) en los chips activados en todas las celdas de flujo. La inmovilización se llevó a cabo a un caudal de 10 µl/min. hasta la saturación. El chip se bloqueó entonces por inyección de 70 µl de etanolamina-HCl, pH 8,5, seguido de un lavado con MgCl<sub>2</sub> 3M. Para medir la unión de los mAb anti-CEACAM5 a la proteína CEACAM5 humana o a la proteína CEACAM5 de macaco, se usaron los anticuerpos a 1-5 µg/ml en amortiguador de migración de BIAcore (HBS-EP). Los antígenos (CEACAM5 humana o CEACAM5 de macaco) se inyectaron de 1 a 500 nM. Después de la finalización de la fase de inyección, se monitorizó la disociación en un amortiguador de migración de BIAcore al mismo caudal durante 600 segundos. La superficie se regeneró entre las inyecciones usando 2 x 5 µl MgCl<sub>2</sub> 3M (2 x 30 s). Los sensogramas individuales se analizaron usando el software BIAevaluation.

Tabla 16: Unión de mAb anti-CEACAM5 humanizado a CEACAM5 humana y de mono

mAb	CEACAM5 humana	CEACAM5 de macaco
	KD (nM)	KD (nM)
huMAb2-1	9,8	41,7
huMAb2-2	24,5	96,0
huMAb2-3	11,7	73,5
huMAb2-4	6,9	38,6
ch MAb2	9,9	52,3

La especificidad de las variantes de MAb2 anti-CEACAM5 humanizadas, comparada con MAb2 quimérico, por CEACAM5 de macaco frente a CEACAM1, CEACAM6 y CEACAM8 de macaco se verificó por ELISA. Se indicó como el porcentaje de unión comparado con la unión completa con CEACAM5 o unión a la CE<sub>50</sub>; véase la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17: Porcentaje de unión de mAb anti-CEACAM5 humanizado a las CEACAM de macaco

código	mAb	CEA de macaco			
		CAM5	CAM1	CAM6	CAM8
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	100%	0,3%	0,3%	3,6%
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	100%	0,3%	0,3%	0,9%
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	100%	0,3%	0,4%	1,2%
huMAb2-4	MAb2_VL1d_VH1-IgG1	100%	0,3%	0,3%	3,2%
ch MAb2	MAb2-IgG1	100%	0,2%	0,3%	1,2%

#### Ejemplo 6.4: Caracterización de variantes humanizadas de Mab2 obtenidas por injerto en marcos de línea germinal humana

En este ejemplo, se obtuvieron variantes humanizadas de Mab2 por una estrategia de injerto de CRD. Además, las CDR del anticuerpo humanizado se sometieron a una estrategia de escaneo de alanina para mostrar que varias posiciones podían sustituirse sin afectar la unión a CEACAM5 humana y de *Macaca fascicularis*.

La secuencia de una versión humanizada de Mab2 se generó en primer lugar in silico seleccionando marcos de línea germinal humana tomando como base la homología estructural con el anticuerpo murino Mab2. Para la cadena ligera, los marcos humanos seleccionados están definidos por los genes IGKV1D-39\*01 y IGKJ2\*02, y para la cadena pesada, por los genes IGHV3-23\*04 y IGHJ4\*01. Las seis CDR de Mab2<sub>K52R</sub> se injertaron en estos marcos

humanos. Se introdujeron tres retromutaciones, correspondientes a las posiciones 34 y 53 en la VL (SEQ ID NO. 34) (regiones FR2-L y FR3-L, respectivamente) y a la posición 50 en la VH (SEQ ID NO. 33) (región FR2-H), que da como resultado la secuencia siguiente, definida como MAb2\_VLg5VHg2.

Tabla 18: Secuencias de VH y VL de MAb2\_VLg5VHg2

Variante VH o VL	Secuencia	SEQ ID NO.
MAb2_VHg2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFVSSYDMSWVR QAPGKGLEWVSYISSGGGITYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLVT VSS	SEQ ID NO:74
MAb2_VLg5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIFSYLAWYQQKP GKAPKLLIYNTRTLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPE DFATYYCQHHYGTPTFTFGQGTKLEIK	SEQ ID NO:75

5 Se obtuvieron varias variantes de MAb2\_VLg5VHg2 por el único reemplazo de cada aminoácido de las seis CDR, preferiblemente por una alanina. Cuando la alanina ya se encontraba en las CDR de MAb2\_VLg5VHg2, lo que ocurre en H-CDR3, se sustituyó otro aminoácido (Val en el resto 97, Arg en el resto 98, y Asp en el resto 108 de SEQ ID NO:74).

10 A partir de las secuencias de aminoácidos de las variantes VL y VH in silico, se derivaron las secuencias de ácido nucleico y se generaron por síntesis génica. Las secuencias se clonaron en un vector de expresión de mamífero fusionadas con las secuencias codificantes del dominio constante de IgG1 humana o de Ckappa humana respectivamente. Las variantes únicas humanizadas MAb2\_VLg5VHg2, que difieren de ésta en una posición, y un número limitado de mutantes de combinación, se produjeron por la expresión transitoria en células HEK293. Los  
15 sobrenadantes celulares que contenían las IgG segregadas (20 a 70 µg/ml) se diluyeron hasta 1 µg/ml para uso en ensayos de unión a ECD de CEACAM5 humana, ECD de *Macaca fascicularis* y dominio A3-B3 de CEACAM5 humana.

20 Para evaluar el impacto de estas modificaciones, la unión de IgG se determinó midiendo las señales de SPR con una unidad Biacore T200 (GE Healthcare). Se acoplaron anticuerpos anti-Fc humano a un chip Series S CM5 mediante un kit de acoplamiento de amina para alcanzar un nivel de 10.000 unidades de respuesta (RU). Aproximadamente 300 a 600 RU de cada variante se capturaron inyectando sobrenadantes a 1 µg/ml con un tiempo de contacto de 60 segundos y un caudal de 10 µl/min. Todos los experimentos se realizaron a 25°C con HBS-EP+ (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05%) como el amortiguador de migración. En un modo de cribado, se inyectó CEACAM5 humana/CEACAM5 de macaco/dominio A3B3 humano a 50 nM sobre las variantes IgG  
25 capturadas, a un caudal de 30 µl/min. durante 1 minuto. Se mantuvo una fase de disociación de 60 segundos antes de que la superficie se regenerara con una inyección de 1 pulso de MgCl<sub>2</sub> 3 M a un caudal de 10 µl/minuto y un tiempo de contacto de 30 segundos.

30 Para cada experimento, se procesaron los datos de respuesta usando una superficie de referencia, permitiendo de esta manera la corrección para cambios en el índice de refracción bruto y cualquier unión no específica. Los datos se referenciaron doblemente usando respuesta de inyecciones de blanco. De acuerdo con el método de cribado descrito en una nota de solicitud de GE Healthcare (nota de solicitud 28-9777-72 AA), se consideraron dos parámetros para clasificar las variantes con respecto a las características de unión. En primer lugar, la actividad de unión se estima por la proporción de la señal máxima teórica medida (porcentaje de R<sub>max</sub>, véase la Figura 16). En segundo lugar, el porcentaje de señal restante se calcula usando puntos indicados de disociación (el primero 10 segundos después del final de la inyección, y el segundo 50 segundos después del final de la inyección), y refleja la  
35 estabilidad de la unión (véase la Figura 17).

40 Las variantes de una sola alanina en las posiciones siguientes demostraron parámetros de unión equivalentes, comparados con el anticuerpo original, lo que sugiere que los aminoácidos de CDR en esas posiciones son neutros para la unión: restos de LC 27, 28, 29, 31, 51,52, 89, 90, 93, 94, 96, 97, y restos HC 26 a 31, 51 a 58, 97, 103, 104, 107, 109. Los comportamientos de estas variantes son similares con CEACAM5 humana y de mono, manteniendo así su reactividad cruzada. También se encontró que la unión al dominio A3-B3 de CEACAM5 no resultaba afectada. También se generaron algunas combinaciones de dos sustituciones neutras, y se encontró que daban como resultado parámetros de unión inalterados, como se ilustra con asociación de LC\_T51A con LC\_T94A, LC\_S31A con HC\_G54Y, o LC\_T53I con HC\_S53A.

45 A la inversa, en todas las demás posiciones de CDR, se encontró que la sustitución del aminoácido original por alanina induce una pérdida completa de unión o alteró drásticamente los parámetros de la unión. La posición 101 de la cadena pesada o las posiciones 32 y 91 de la cadena ligera son ejemplos mostrados en las Figuras 16 y 17. Un segundo conjunto de variantes consistió en ensayar más mutaciones conservativas en algunas de dichas posiciones. Haciendo esto, encontramos que las sustituciones conservativas siguientes eran neutras para la unión al antígeno: Tyr por Phe en el resto 30 de MAb2\_VLg5, Phe por Tyr en el resto 92 del MAb2\_VLg5, Ser por Ala en el  
50 resto 98 de MAb2\_VHg2 y Phe por Tyr en el resto 100 de MAb2\_VHg2 (mostrados en las figuras).

**Ejemplo 7: variantes humanizadas de conjugados de MAb2 fármaco****Ejemplo 7.1: Producción y caracterización**

huMAb2-2-SPDB-DM4

Datos analíticos:

5 MW(Ab) = 147360 g/mol; MW(DM4) = 780,38 g/mol

 $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 201400$ ;  $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 71693$  $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 5180$ ;  $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 26159$ 

10 Con agitación, a RT, se introducen 19,4 mg de huMAb2-2 (C = 5,1 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 0,375 ml de DMA y 0,0439 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (5,0 eq - disolución 15 mM en DMA). La disolución se somete a vórtice durante 30 segundos y se agita lentamente a RT durante 2 horas. Se añade un volumen extra de 0,0044 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (5,0 eq - disolución 15 mM en DMA). Después de 2 horas a RT con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 2 ml de amortiguador de PBS pH = 7,5 y 0,0702 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 2 horas a RT, la mezcla de reacción bruta se filtra en un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se purifica en una columna desaladora HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), preacondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5. El conjugado se eluye con histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

20 Se obtienen así 10,3 ml de conjugado huMAb2-2-SPDB-DM4 (c = 1,35 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 3,7; DAR (SEC) = 3,6; RT = 17,29 min.; pureza monomérica = 97,9%.

El resultado del análisis de HRMS se muestra en la Figura 12.

huMAb2-1-SPDB-DM4

Datos analíticos:

25 MW(Ab) = 147563 g/mol; MW(DM4) = 780,38 g/mol

 $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 201400$ .  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{Ab}) = 69669$  $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 5180$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{DM4}) = 26159$ 

30 Con agitación, a RT, se introducen 3,8 ml de una disolución de huMAb2-1 (C = 5,08 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 0,341 ml de DMA y 0,0392 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (4,5 eq - disolución 15 mM en DMA). La disolución se somete a vórtice durante 30 segundos y se agita lentamente a RT durante 3 horas. Se añade un volumen extra de 0,0087 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (1,0 eq - disolución 15 mM en DMA). Después de 2 horas a RT con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 2,62 ml de amortiguador de PBS pH 7,5, 0,254 ml de DMA y 0,076 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 1 hora a RT, la mezcla de reacción bruta se filtra en un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se purifica en una columna desaladora HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), preacondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5. El conjugado se eluye con histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

40 Se obtienen así 9,5 ml de conjugado huMAb2-1-SPDB-DM4 (c = 1,35 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 4,1; DAR (SEC) = 4,0; RT = 17,39 min.; pureza monomérica = 96,7%.

El resultado del análisis de HRMS se muestra en la Figura 13.

huMAb2-3-SPDB-DM4

Datos analíticos:

45 MW(Ab) = 147417 g/mol; MW(DM4) = 780,38 g/mol

 $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 201400$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{Ab}) = 71451$  $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 5180$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{DM4}) = 26159$

Con agitación, a RT, se introducen 3,8 ml de una disolución de huMAb2-3 (C = 5,09 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 0,336 ml de DMA y 0,0437 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (5 eq - disolución 15 mM en DMA). La disolución se somete a vórtice durante 30 segundos y entonces se agita lentamente a RT durante 3 horas. Se añade un volumen extra de 0,0035 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (0,4 eq - disolución 15 mM en DMA). Después de 1 hora a RT con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 2,60 ml de amortiguador de PBS pH 7,5, 0,248 ml de DMA y 0,074 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 1 hora a RT, la mezcla de reacción bruta se filtra en un filtro de 0,45 µm y se purifica en una columna desaladora HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), preacondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5. El conjugado se eluye con histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan y se filtran en un filtro de 0,22 µm.

Se obtienen así 11 ml de conjugado huMAb2-3-SPDB-DM4 (c = 1,08 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 3,9; DAR (SEC) = 3,8; RT = 17,44 min.; pureza monomérica = 98,4%.

El resultado del análisis de HRMS se muestra en la Figura 14.

huMAb2-4-SPDB-DM4

Datos analíticos:

MW(Ab) = 147628 g/mol; MW(DM4) = 780,38 g/mol

$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 201400$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{Ab}) = 70628$

$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 5180$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{DM4}) = 26159$

Con agitación, a RT, se introducen 3,8 ml de una disolución de huMAb2-4 (C = 5,09 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 0,345 ml de DMA y 0,0448 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (5 eq - disolución 15 mM en DMA). La disolución se somete a vórtice durante 30 segundos y entonces se agita lentamente a RT durante 3 horas. Se añade un volumen extra de 0,0027 ml de disolución de enlazador nitro-SPDB (0,3 eq - disolución 15 mM en DMA). Después de 1 hora a RT con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 2,70 ml de amortiguador de PBS pH 7,5, 0,263 ml de DMA y 0,075 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 1 hora a RT, la mezcla de reacción bruta se filtra en un filtro de 0,45 µm y se purifica en una columna desaladora HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), preacondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5. El conjugado se eluye con histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan y se filtran en un filtro de 0,22 µm.

Se obtienen así 11 ml de conjugado huMAb2-4-SPDB-DM4 (c = 1,23 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 3,8; DAR (SEC) = 3,8; RT = 17,53 min.; pureza monomérica = 99,3%.

El resultado del análisis de HRMS se muestra en la Figura 15.

### Ejemplo 7.2: Citotoxicidad *in vitro*

Material y métodos:

El efecto de los conjugados anti-CEACAM5 maitansinoide sobre la viabilidad de las células tumorales se evaluó como se describe en el ejemplo 3.4.

Resultados:

Tabla 19: Actividades citotóxicas de los ADC humanizados específicos de CEACAM5 sobre la línea celular CEACAM5+ MKN45

ADC	Actividad citotóxica $CI_{50}$ (nM) $\pm$ StD
chMAb2-SPDB-DM4	0,24 $\pm$ 0,02
huMAb2-1-SPDB-DM4	0,18 $\pm$ 0,01
huMAb2-2-SPDB-DM4	0,23 $\pm$ 0,02
huMAb2-3-SPDB-DM4	0,16 $\pm$ 0,01
ADC irrelevante	8,52 $\pm$ 2,07

Estos conjugados chMAb2-SPDB-DM4, huMAb2-1-SPDB-DM4, huMAb2-2-SPDB-DM4, y huMAb2-3-SPDB-DM4 y el conjugado de DM4 irrelevante mostraron actividades citotóxicas *in vitro* en células MKN45 en cultivo con una  $CI_{50}$  de 0,24, 0,18, 0,23, 0,16, y 8,52 nM, respectivamente. Las actividades citotóxicas de los conjugados anti-CEACAM5

fueron 53 a 35 veces menores que la actividad medida del conjugado de DM4 irrelevante, indicando actividades citotóxicas mediadas por CEACAM5 de los conjugados anti-CEACAM5.

**Ejemplo 7.3: Eficacia *in vivo* frente a tumores de colon primarios CR-IGR-034P implantados s.c. en ratones hembra atímicos CD-1**

5 Material y método

Dos secuencias humanizadas como conjugados huMAb2-3-SPDB-DM4 y huMAb2-4-SPDB-DM4 se evaluaron a niveles de 4 dosis comparado con chMAb2-SPDB-DM4, frente a tumores de colon primario medibles CR-IGR-034P implantados s.c. en ratones hembra atímicos CD-1. Los grupos de control se dejaron sin tratar. Las dosis de los conjugados se proporcionaron en mg/kg. Se administraron a 10, 5, 2,5 y 1,25 mg/kg por una inyección de bolo intravenosa (IV) en el día 19 después del implante del tumor.

La evaluación de la toxicidad y eficacia se realizó como se indica en el ejemplo 5.

Resultados:

Los resultados se presentan en la Figura 5 y en la Tabla 20 (más adelante).

15 Usando un esquema de una única administración a 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/kg, ninguno de los conjugados ensayados en este estudio indujo toxicidad.

20 huMAb2-4-SPDB-DM4 y chMAb2-SPDB-DM4 fueron altamente activos a 10 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de -4% ( $p < 0,0001$  frente al control) y regresión tumoral de 21 y 19%, respectivamente; activos a 5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 12 ( $p = 0,0105$  frente al control) y 17% ( $p = 0,0417$  frente al control), respectivamente; y marginalmente activos a 2,5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 36 y 37% (ns frente al control), respectivamente; e inactivos a 1,25 mg/kg. huMAb2-3-SPDB-DM4 fue altamente activo a 10 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de -6% ( $p < 0,0001$  frente al control) y regresión tumoral de 31%; muy activo a 5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 4% ( $p < 0,0001$  frente al control); activo a 2,5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 12 ( $p = 0,0322$  frente al control); y marginalmente activo a 1,25 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 34% (ns frente al control).

A partir de estos resultados, las dos secuencias humanizadas huMAb2-3-SPDB-DM4 y huMAb2-4-SPDB-DM4 fueron usables para desarrollar un ADC terapéutico. huMAb2-3-SPDB-DM4 fue la mejor de las dos secuencias.

25

Tabla 20: Evaluación de la actividad anti-tumoral de los conjugados huMAb2-3-SPDB-DM4 y huMAb2-4-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de colon humano primario CR-IGR-034P en ratones hembra CD-1.

Agente <sup>1</sup>	Ruta/ Dosis en ml/Kg	Dosis en mg/kg por inyección	Calendario en días	Muerte por fármaco (Día)	Cambio promedio de peso corporal en % por ratón en el nadir (día de nadir)	ΔT/ΔC mediano en % (día)	% mediano de regresión (día)	Regresiones		Valor de p biostatístico <sup>2</sup>	Comentarios
								Parcial	Completa		
chMAb2- SPDB- DM4	IV (10 ml/Kg)	10	19	0/6	-7,3 (D20)	-4 (D32)	19 (D32)	2/6	0/6	< 0,0001	Altamente activo
		5	19	0/6	-4,5 (D45)	12 (D32)	-	0/6	0/6	= 0,0105	Activo
		2,5	19	0/6	-4,2 (D20)	36 (D32)	-	-	0/6	0/6	ns
huMAb2- 3-SPDB- DM4	IV (10 ml/Kg)	1,25	19	0/6	-4,1 (D20)	42 (D32)	-	0/6	0/6	ns	Inactivo
		10	19	0/6	-4,3 (D27)	-6 (D35)	31 (D35)	2/6	0/6	< 0,0001	Altamente activo
		5	19	0/6	-3,3 (D20)	4 (D38)	-	0/6	0/6	< 0,0001	Muy activo
huMAb2- 4-SPDB- DM4	IV (10 ml/Kg)	2,5	19	0/6	-5,4 (D45)	12 (D38)	-	0/6	0/6	= 0,0322	Activo
		1,25	19	0/6	-3,0 (D27)	34 (D38)	-	0/6	0/6	ns	Marginalmente activo
		10	19	0/6	-3,7 (D22)	-4 (D32)	21 (D32)	2/6	0/6	< 0,0001	Muy activo
Control	-	5	19	0/6	-3,2 (D27)	17 (D32)	-	0/6	0/6	= 0,0417	Muy activo
		2,5	19	0/6	-3,4 (D20)	37 (D32)	-	0/6	0/6	ns	Marginalmente activo
		1,25	19	0/6	-2,8 (D27)	50 (D32)	-	0/6	0/6	ns	Inactivo
			19	-	-3,9 (D24)			-	-		

<sup>1</sup>: formulación del fármaco: HGS (histidina 10 mM, glicina 130 mM, Tween80 al 5% v/v, sacarosa al 0,01%) pH 7,4;

<sup>2</sup>: valor de p: Prueba de Dunnett frente a control después de Anova de 2 vías con medidas repetidas sobre cambios transformados en rangos de volumen tumoral desde la línea base; ns: no significativo

**Ejemplo 7.4: Eficacia *in vivo* frente a tumores de estómago primarios STO-IND-006 implantados s.c. en ratones hembra SCID**

Material y método

- 5 El conjugado humanizado huMAb2-3-SPDB-DM4 se evaluó a 3 niveles de dosis frente a tumores de estómago primarios medibles STO-IND-006 implantados s.c. en ratones hembra SCID. Los grupos de control se dejaron sin tratar. Las dosis de los conjugados se proporcionaron en mg/kg. Se administraron a 10, 5 y 2,5 mg/kg por una inyección de bolo intravenosa (IV) en el día 27 después del implante del tumor.

La evaluación de la toxicidad y eficacia se realizó como se indica en el ejemplo 5.

Resultados:

- 10 Usando un esquema de una única administración a 2,5, 5 y 10 mg/kg, huMAb2-3-SPDB-DM4 no indujo toxicidad.

Como se muestra en la Figura 6 y en la Tabla 21, huMAb2-3-SPDB-DM4 fue muy activo a 10 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 7% ( $p < 0,0001$  frente al control); activo a 5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 36% ( $p = 0,0281$  frente al control); e inactivo a 2,5 mg/kg.

Tabla 21: Evaluación de la actividad anti-tumoral de los conjugados huMAb2-3-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de estómago humano primario STO-IND-006 en ratones hembra SCID

Agente <sup>1</sup>	Ruta/ Dosis en ml/kg	Dosis en mg/kg por inyección	Calendario en días	Muerte por fármaco (Día)	Cambio promedio de peso corporal en % por ratón en el nadir (día de nadir)	ΔT/ΔC mediano en % (día)	% mediano de regresión (día)	Regresiones		Valor de p bioestadístico <sup>2</sup>	Comentarios
								Parcial	Completa		
huMAb2-3-SPDB-DM4	IV (10 ml/Kg)	10	27	0/6	-10.5 (D45)	7 (D34)	-	0/6	0/6	< 0.0001	Muy activo
		5	27	0/6	-8.4 (D45)	36 (D45)	-	0/6	0/6	= 0.0281	Activo
		2.5	27	0/6	-5.8 (D45)	50 (D38)	-	0/6	0/6	ns	Inactivo
Control	-	-	27	-	-2.5 (D38)	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>: formulación del fármaco: HGS (histidina 10 mM, glicina 130 mM, sacarosa al 5% v/v, Tween80 al 0.01%) pH 7,4;

<sup>2</sup>: valor de p: Prueba de Dunnett frente a control después de Anova de 2 vías con medidas repetidas sobre cambios transformados en rangos de volumen tumoral desde la línea base; ns: no significativo

**Ejemplo 7.5: Eficacia *in vivo* frente a tumores de pulmón primarios LUN-NIC-0014 implantados s.c. en ratones hembra SCID**

Material y método

- 5 El conjugado humanizado huMAb2-3-SPDB-DM4 se evaluó a 3 niveles de dosis frente a tumores de pulmón primarios medibles LUN-NIC-0014 implantados s.c. en ratones hembra SCID. Los grupos de control se dejaron sin tratar. Las dosis de los conjugados se proporcionaron en mg/kg. Se administró a 10, 5 y 2,5 mg/kg por una inyección de bolo intravenosa (IV) en el día 29 después del implante del tumor.

La evaluación de la toxicidad y eficacia se realizó como se indica en el ejemplo 5.

Resultados

- 10 Usando un esquema de una única administración a 2,5, 5 y 10 mg/kg, huMAb2-3-SPDB-DM4 no indujo toxicidad.

Como se muestra en la Figura 18 y en la Tabla 22, huMAb2-3-SPDB-DM4 fue altamente activo a 10 y 5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  inferior a 0% ( $p < 0,0001$  frente al control) y regresión tumoral de 67 y 57%, respectivamente; y activo a 2,5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 12% ( $p = 0,0363$  frente al control).

15

Tabla 22: Evaluación de la actividad anti-tumoral del conjugado huMAb2-3-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de pulmón humano primario LUN-NIC-0014 en ratones hembra SCID

Agente <sup>1</sup>	Ruta/ Dosis en ml/kg	Dosis en mg/kg por inyección	Calendario en días	Muerte por fármaco (Día)	Cambio promedio de peso corporal en % por ratón en el nadir (día de nadir)	ΔT/ΔC mediano en % (día42)/% (día)	% mediano de regresión (día42)	Regresiones		Valor de p bioestadístico <sup>2</sup>	Comentarios
								Parcial	Completa		
huMAb2-3- SPDB- DM4		10	29	0/6	+1,7 (D32)	< 0	67	5/6	1/6	< 0,0001	Muy activo
		5	29	0/6	-1,1 (D36)	< 0	57	4/6	0/6	< 0,0001	Muy activo
		2,5	29	0/6	+0,5 (D32)	12 (D39)	-	0/6	0/6	0,0363 (D39)	Activo
Control	-	-	-	-	+0,1 (D34)	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>: formulación del fármaco: HGS (histidina 10 mM, glicina 130 mM, sacarosa al 5% v/v, Tween80 al 0,01%) pH 7,4; <sup>2</sup>: valor de p: Prueba de Dunnett frente a control después de Anova de 2 vías con medidas repetidas sobre cambios transformados en rangos de volumen tumoral desde la línea base.

**Ejemplo 7.6: Eficacia *in vivo* frente a tumores de colon primarios CR-IGR-034P implantados s.c. en ratones hembra SCID**

5 Material y método

Tres conjugados, constituidos por el huMAb2-3 humanizado conjugado con el DM4 a través de dos enlazadores diferentes (SPDB y sulfo-SPDB), se evaluaron a 2 niveles de dosis frente a tumores de colon primario medibles CR-IGR-034P implantados s.c. en ratones hembra SCID. Los grupos de control se dejaron sin tratar. Las dosis de los conjugados se proporcionaron en mg/kg. Se administraron a 5 y 2,5 mg/kg por una inyección de bolo intravenosa (IV) en el día 19 después del implante del tumor.

La evaluación de la toxicidad y eficacia se realizó como se indica en el ejemplo 5.

Resultados

Usando un esquema de una única administración a 2,5 y 5 mg/kg, huMAb2-3-SPDB-DM4 y huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 no indujeron toxicidad.

15 Como se muestra en la Figura 19 y en la Tabla 23, huMAb2-3-SPDB-DM4 fue activo a 5 y 2,5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 12% y 40%, respectivamente ( $p < 0,0001$  frente al control); huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 fue altamente activo a 5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  inferior a 0% ( $p < 0,0001$  frente al control) y una regresión tumoral de 12%; y activo a 2,5 mg/kg con  $\Delta T/\Delta C$  de 1% ( $p < 0,0001$  frente al control).

Tabla 23: Evaluación de la actividad anti-tumoral de los conjugados huMAb2-3-SPDB-DM4 y huMAb2-3-sulfo-SPDB-DM4 frente a adenocarcinoma de colon humano primario CR-IGR-034P en ratones hembra SCID

Agente <sup>1</sup>	Ruta/ Dosis en ml/kg	Dosis en mg/kg por inyección	Calendario en días	Muerte por fármaco (Día)	Cambio promedio de peso corporal en % por ratón en el nadir (día de nadir)	ΔT/ΔC mediano en (día34)	% mediano de regresión (día34)	Regresiones		Valor de p bioestadístico <sup>2</sup>	Comentarios
								Parcial	Completa		
huMAb2-3- SPDB-DM4	IV (10 ml/kg)	5	19	0/6	+1,6 (D20)	12	-	0/6	0/6	< 0,0001	Activo
		2,5	19	0/6	-1,5 (D38)	40	-	0/6	0/6	< 0,0001	Marginalmente activo
huMAb2-3- sulfo-SPDB- DM4	IV (10 ml/kg)	5	19	0/6	+0,1 (D20)	< 0	12	0/6	0/6	< 0,0001	Altamente activo
		2,5	19	0/6	+0,7 (D20)	11	-	0/6	0/6	< 0,0001	Activo
		2,5	19	0/6	+2,5 (D20)	66	-	0/6	0/6	0,0306	Inactivo
Control	-	-	-	-	+0,5 (D34)	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>: formulación del fármaco: HGS (histidina 10 mM, glicina 130 mM, sacarosa al 5% v/v, Tween80 al 0,01%) pH 7,4; <sup>2</sup>: valor de p: Prueba de Dunnett frente a control después de Anova de 2 vías con medidas repetidas sobre cambios transformados en rangos de volumen tumoral desde la línea base.

**Ejemplo 8: Desarrollo de un protocolo de inmunohistoquímica (IHC) dedicado a la detección de proteína CEACAM5 humana y de mono en tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina (FFPE).**

Materiales y métodos

Tejidos

- 5 Se usaron micromatrices de tejido FFPE (TMA, Tabla 24) como fuente de tejidos humanos (tumoraes y no tumoraes) así como de mono macaco (normales).

Tabla 24: Micromatrices de tejido fijado en formalina y embebido en parafina usadas como fuentes de tejido

Referencia	Proveedor	Descripción
ASM221	Pantomics	Macaco, 22 órganos, 22 muestras
CyFDA	US Biomax	Micromatriz de tejido normal de macaco, 33 órganos, tomados de 6 individuos normales (99 casos)
COC1501	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de colon, 150 núcleos de tejido normal/benigno (5 casos) y canceroso (70 casos)
COC1502	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de colon, 150 núcleos de tejido normal/benigno (5 casos) y canceroso (70 casos)
COC1503	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de colon, 150 núcleos de tejido normal/benigno (5 casos) y canceroso (70 casos)
MTU951	Pantomics	40 tipos de tumores abarcando entidades benignas, malignas y metastásicas de 27 sitios anatómicos
LUC1501	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de pulmón, 150 núcleos de tejido normal/benigno (5 casos) y canceroso (70 casos)
LUC1502	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de pulmón, 150 núcleos de tejido normal/benigno (5 casos) y canceroso (70 casos)
LUC1503	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de pulmón, 150 núcleos de tejido normal/benigno (5 casos) y canceroso (70 casos)
MNO961	Pantomics	35 tipos de tejidos normales basado en la recomendación de la FDA para ensayo de reactividad cruzada de anticuerpos.
MNO661	Pantomics	33 tipos de tejidos normales basado en la recomendación de la FDA para ensayo de reactividad cruzada de anticuerpos.
MNO341	Pantomics	33 tipos de tejidos normales basado en la recomendación de la FDA para ensayo de reactividad cruzada de anticuerpos.
PAC481	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer pancreático que contiene 20 casos de cánceres y 4 casos de tejido pancreático normal y no maligno
CC4	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 59 casos de cáncer de pulmón
A218(III)	Accumax	Matriz de tejido de cáncer de esófago que contiene 40 casos de tumores y 8 no neoplásicos
A219(II)	Accumax	Matriz de tejido de cáncer de cabeza y cuello que contiene 45 casos de tumores y 8 no neoplásicos
A213(II)	Accumax	Matriz de tejido de cáncer de ovario que contiene 43 casos de tumores y 8 no neoplásicos
A301(IV)	Accumax	Matriz con varios tejidos cancerosos con tejidos normales correspondientes (30 casos de cáncer, 30 casos no neoplásicos)
A103(V)	Accumax	Matriz con varios tejidos normales por duplicado (45 casos)
MAN2	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 9 o 10 casos normales de estómago, esófago,

Referencia	Proveedor	Descripción
		pulmón, colorrectal, tiroides y riñón
MA2	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 9 o 10 casos de cánceres de estómago, de esófago, de pulmón, colorrectal, de tiroides y de riñón
MBN4	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 9 o 10 casos normales de mama, hígado, vejiga urinaria, ovario, páncreas, próstata
MB4	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 9 o 10 casos de cánceres de mama, de hígado, de vejiga urinaria, de ovario, de páncreas, de próstata
MCN4	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 9 o 10 casos normales de endometrio, vesícula biliar, laringe, cuello uterino, piel
MC4	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 9 o 10 casos de cánceres de endometrio, de vesícula biliar, de laringe, de cuello uterino, linfoma o melanoma
CJ1	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 59 casos de cáncer de ovario
CDN3	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 59 casos de colon y recto normales
CCN2	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 59 casos de pulmón normal (equivalente CC4)
BB5	Superbiochips	60 núcleos, 30 de varios tipos de cánceres humanos
AA9	Superbiochips	Matriz de 59 núcleos que incluye 59 casos de órganos normales
TMAhu3a	Astery	Matriz de varios tejidos cancerosos (76 casos)
STC1501	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de estómago, 150 núcleos que incluyen 75 casos de tejidos normales, reactivos y cancerosos del estómago
STC1502	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de estómago, 150 núcleos que incluyen 75 casos de tejidos normal, reactivos y cancerosos del estómago
STC1503	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de estómago, 150 núcleos que incluyen 75 casos de tejidos normal, reactivos y cancerosos del estómago
STC481	Pantomics	Matriz de tejido de cáncer de estómago, 16 casos, 48 núcleos, uno normal emparejado con dos núcleos de tejido tumoral de cada paciente

#### Anticuerpos

5 MA2 se usó como anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-CEACAM5 humana. Una IgG1 de cabra anti-ratón conjugada con biotina (específica de cadena  $\gamma 1$ ) (referencia 1070-08, lote L4309-X761, Southern Biotech, USA) se usó como anticuerpo secundario.

#### Inmunotinción

10 El procedimiento de recuperación del antígeno se aplicó con amortiguador Cell Conditioning 1 (CC1) a 95°C durante 8 min., y después a 100°C durante 28 min. Después de una etapa de bloqueo de biotinas endógenas, los portaobjetos se incubaron con el anti-anticuerpo primario diluido en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) a 5  $\mu\text{g/ml}$  durante 2 horas a 24°C. El anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con biotina se incubó a 24°C durante 32 minutos a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . La inmunotinción se hizo con tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobenzidina (DAB) del kit de detección cromogénico DABMap™ (760-124, Ventana Medical Systems, Inc, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se realizó una etapa de contratinción con hematoxilina (760-2037, Ventana Medical Systems, Inc, USA) y se aplicó reactivo azulado (760-2037, Ventana Medical Systems, Inc, USA). Los portaobjetos teñidos se deshidrataron y se cubrieron con cubreobjetos con cyto seal XYL (8312-4, Richard-Allan Scientific, USA).

#### Puntuación de IHC

Los portaobjetos inmunoteñidos se escanearon usando el sistema ScanScope XT (Aperio Technologies, Vista, CA). Se capturaron imágenes digitalizadas usando el software ImageScope (versión 10.2.2.2319, Aperio Technologies) a un aumento de x20.

La evaluación de la tinción incluyó el sitio histológico de reactividad, tipo principal de célula reactiva, intensidad de la tinción y frecuencia de la tinción celular. Las muestras negativas se puntuaron como 0+. Las muestras positivas se puntuaron con una escala de intensidad de 1+ a 4+. Los intervalos de intensidades se describieron como débil [0;2+[, moderada [2+;3+[, y fuerte [3+;4+]. La frecuencia celular fue el porcentaje de células inmunoteñidas, y se estimó por la observación del histólogo como una mediana por muestra. La frecuencia celular se ordenó en 5 categorías de puntuación de proporción: 1 (0-5%), 2 (6-25%), 3 (26-50%), 4 (51-75%) y 5 (76-100%).

Para los tumores, se adaptó una puntuación de expresión global de la puntuación Allred (AS) (Mohsin S, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh LD, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. Mod. Pathol. 2004; 17:1545-1554). Esta AS se obtuvo sumando las puntuaciones de intensidad y proporción para obtener una puntuación total que varía de 0-9. La AS se dio como un porcentaje de la puntuación global máxima y varió en 5 categorías: muy baja (0-25%), débil (26-50%), moderada (51-75%), y alta (76-100%). La prevalencia se definió como el porcentaje de casos positivos para la indicación.

#### Análisis estadístico descriptivo

Las estadísticas descriptivas se calcularon con el software Microsoft Excel 2003. Para cada indicación se describieron número de casos, número de casos positivos, prevalencia, mediana de la puntuación de intensidad, mediana de la frecuencia, media de la puntuación Allred, intervalo de intensidad, intervalo de frecuencia e intervalo de puntuación Allred.

#### **Ejemplo 8.1: Uso de un anticuerpo monoclonal anti-CEACAM5 para la evaluación de la proteína CEACAM5 en tumores humanos FFPE por inmunohistoquímica (IHC)**

Se estudió un gran panel de tumores humanos usando portaobjetos de matrices de tejido comerciales (formato FFPE). La expresión de la proteína CEACAM5 se localizó en membrana +/-citoplasma de las células tumorales (Figura 1C, D). Parte de la tinción de membrana estaba polarizada en el polo apical de las células en los tumores más diferenciados. Se encontró que la proteína CEACAM5 se expresa en:

- 89% de casos de adenocarcinoma de colon (194/219, intensidad 2-2,5+, frecuencia 53-59%, AS 60-66%)
- 49% de casos de adenocarcinoma de estómago (95/195, intensidad 2,5+, frecuencia 53%, AS 62%)
- 41% de casos de adenocarcinoma de pulmón (24/58, intensidad 1,8-2+, frecuencia 50-53%, AS 54-58%)
- 79% de casos de carcinoma escamoso de cuello de útero (11/14, intensidad 2+, frecuencia 22%, AS 46%)
- 53% de casos de adenocarcinoma de páncreas (18/34, intensidad 2+, frecuencia 23%, AS 42%)
- 37% de casos de carcinoma de células escamosas de esófago (23/62, intensidad 2+, frecuencia 16%, AS 38%)
- 4% de casos de carcinoma de ovario (3/77, intensidad 2+, frecuencia 43%, AS 54%)
- 11% de casos de carcinoma de tiroides (2/18, intensidad 1,5+, frecuencia 63%, AS 56%)
- 25% de casos de carcinoma de vejiga (5/20, intensidad 1,5+, frecuencia 61%, AS 56%)
- 7% de casos de adenocarcinoma de endometrio (1/14, intensidad 2+, frecuencia 50%, AS 56%)
- 11% de casos de carcinoma ductal de mama (2/18, intensidad 1,5+, frecuencia 53%, AS 50%)
- 53% de casos de colangiocarcinoma (2/6, intensidad 1,5+, frecuencia 75%, AS 50%)
- 53% de casos de carcinoma de células escamosas de pulmón (31/148, intensidad 1,5+, frecuencia 22%, AS 39%)
- 8% de casos de adenocarcinoma de próstata (1/13, intensidad 2+, frecuencia 50%, AS 44%)
- 25% de casos de carcinoma escamoso de la piel (2/8, intensidad 1,5+, frecuencia 23%, AS 39%)

#### **Ejemplo 8.2: Reactividad cruzada en tejidos de un anticuerpo monoclonal anti-CEACAM5 en mono Macaco (*Macaca fascicularis*) y comparación con el patrón de expresión humano**

El dominio extracelular de la proteína de CEACAM5 de origen humano (h) o de mono macaco (c) se ha preparado mediante expresión transitoria en células de riñón embrionario humano HEK293 con el plásmido de ADNc de CEACAM5 (ejemplo 1, Tabla 1). Los peletes celulares se fijaron en formalina al 10% (Sigma Aldrich, USA) durante 16 horas, y se embebieron en parafina como una pieza de tejido de acuerdo con el procedimiento histológico estándar.

Se usaron TMA comerciales como fuente de tejido normal humano y de mono (Tabla 21).

La reactividad cruzada de Mab2 se mostró por inmunotinción en las células transfectadas tanto con CEACAM5 humana como de mono (localización en la membrana y el citoplasma).

5 En tejidos normales de macaco, la expresión de la proteína CEACAM5 se encontró en células epiteliales columnares absorbentes (2/3 casos positivos, intensidad mediana 1,5+, frecuencia media 55%).

En tejidos no tumorales humanos, la expresión de CEACAM5 también se observó en células epiteliales columnares absorbentes (62/64 casos positivos, intensidad mediana 2+, frecuencia media 90%). En los tejidos humanos, la expresión de CEACAM5 se observó en menor grado en células epiteliales del esófago, células epiteliales de cabeza y cuello, células epiteliales de la fosa gástrica del estómago, y células epiteliales del cuello uterino.

#### 10 **Ejemplo 9: Conjugado de anticuerpo fármaco (variante)**

huMAb2-3-antiCEACAM5-sulfo-SPDB-DM4

Datos analíticos:

$MW(\text{Ab}) = 147417 \text{ g/mol}$ ;  $MW(\text{DM4}) = 780,38 \text{ g/mol}$

$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 201400$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{Ab}) = 71451$

15  $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM4}) = 5180$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{DM4}) = 26159$

Con agitación, a RT, se introducen 7,0 ml de una disolución de huMAb2-3 antiCEACAM5 (C = 5,32 mg/ml en amortiguador de PBS pH = 7,4) en un recipiente, seguido de 1,6 ml de DMA y 168,4  $\mu\text{l}$  de disolución de enlazador nitro-sulfoSPDB (descrito en el documento WO2009134977) (10 eq - disolución 15 mM en DMA). La disolución se agita lentamente a RT durante 3 horas. Se añade un volumen extra de 3,4  $\mu\text{l}$  de disolución de enlazador nitro-SPDB (2,0 eq - disolución 15 mM en DMA). Después de 2 horas a RT con agitación magnética, se añadieron sucesivamente 2,90 ml de amortiguador de PBS pH 7,4, 0,407 ml de DMA y 0,322 ml de disolución de DM4 (disolución 15 mM en DMA). Después de 1 hora a RT, y 16 horas a 5°C, la mezcla de reacción bruta se purifica en una columna desaladora HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), preacondicionada con 1 CV de NaOH 1M, 2 CV de agua y 2 CV de histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5. El conjugado se eluye con histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

30 Se obtienen así 19 ml de conjugado huMAb2-3-antiCEACAM5-sulfoSPDB-DM4 (c = 1,51 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 3,4; DAR (SEC) = 3,3; pureza monomérica = 99,8%; datos de HRMS: véase la Figura 20.

huMAb2-3 antiCEACAM5-SMCC-DM1

Datos analíticos:

$MW(\text{Ab}) = 147417 \text{ g/mol}$ ;  $MW(\text{DM1}) = 738 \text{ g/mol}$

$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{Ab}) = 201400$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{Ab}) = 71451$

35  $\epsilon_{280\text{nm}}(\text{DM1}) = 5180$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}(\text{DM1}) = 26159$

40 Con agitación, a RT, se introducen 11,3 ml de una disolución de huMAb2-3 antiCEACAM5 (C = 3,47 mg/ml en amortiguador A pH = 6,5) en un recipiente, seguido de 0,387 ml de DMA y 178  $\mu\text{l}$  de disolución de enlazador SMCC (10 eq - disolución 15 mM en DMA). La disolución se agita lentamente a RT durante 2 horas. Se intercambia el amortiguador de la mezcla de reacción bruta en una columna desaladora HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), preacondicionada con 2 CV de NaOH 0,2M, 5 CV de agua y 5 CV de amortiguador de citrato (pH 5,5). El conjugado se eluye con amortiguador de citrato (pH 5,5), y las fracciones de conjugado monomérico se combinan y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . A esta disolución se añaden sucesivamente, con agitación, a RT, 0,476 ml de DMA y 0,124 ml de disolución de DM1 (disolución 15 mM en DMA). Después de 2 horas a RT, la mezcla de reacción bruta se purifica dos veces en una columna desaladora HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), preacondicionada con 2 CV de NaOH 0,2M, 5 CV de agua y 5 CV de histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5. El conjugado se eluye con histidina (10 mM), glicina (130 mM), sacarosa (5%), amortiguador pH = 5,5, y las fracciones de conjugado monomérico se combinan y se filtran en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

50 Se obtienen así 9,5 ml de huMAb2-3 antiCEACAM5-SMCC-DM1 (c = 1,73 mg/ml) como una disolución transparente incolora. El conjugado se analiza entonces para determinar la carga final de fármaco y la pureza monomérica: DAR (UV) = 2,7; DAR (SEC) = 2,9; pureza monomérica = 99,6%; datos de HRMS: véase la Figura 21.

### **Ejemplo 10: Caracterización del epítipo y del paratopo de A3B3 de CEACAM5 en complejo con Fab de MAb2\_VH1aVL1c usando intercambio de hidrógeno-deuterio asociado con espectrometría de masas (HDX MS)**

#### **Ejemplo 10.1: Principio de HDX MS**

- 5 El intercambio de hidrógeno-deuterio de amida (HDX) asociado con espectrometría de masas (MS) permite la identificación de regiones de proteínas implicadas en cambios conformacionales o interacciones. Esta técnica permite más específicamente identificar las regiones de un antígeno que muestran, después de incubación en un amortiguador deuterado y proteólisis, una disminución de la incorporación de deuterio en su forma unida a un anticuerpo comparado con su forma libre.
- 10 El epítipo pertenece a estas regiones, cuyo intercambio se ralentiza por la unión al anticuerpo. Un artículo reciente describe con detalle las diferentes etapas para caracterizar epítopos usando esta estrategia (Zhang, Q., Willison, L. N., Tripathi, P., Sathe, S. K., Roux, K. H., Emmett, M. R., Blakney, G. T., Zhang, H. M. y Marshall, A. G. (2011). *Analytical Chemistry* 83, 7129-7136.).

#### **Ejemplo 10.2: Materiales**

- 15 Las secuencias codificantes del dominio variable de MAb2\_VH1aVL1c (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:29) se clonaron en un vector de expresión de mamíferos en fusión con las secuencias codificantes del dominio CH1 humano (como se encuentra en los Fabs derivados de IgG1 escindida por papaína), seguido de una etiqueta de hexa-histidina, o con el dominio constante Ckappa humano, respectivamente. Se produjo un lote de Fab de MAb2\_VH1aVL1c en células HEK293-FS™ cultivadas en suspensión por transfección transitoria de dos plásmidos de expresión, que
- 20 codifican las dos cadenas, formando un complejo con 293fectin™ (Invitrogen). El sobrenadante del cultivo que contiene la proteína segregada se recolectó siete días después de la transfección, se centrifugó y se filtró en una membrana de 0,22 µm. El Fab se purificó por cromatografía de afinidad en IMAC (HisTrap, GE Healthcare) usando gradiente de imidazol en PBS. Después, el conjunto de fracciones que contiene el Fab se purificó por cromatografía de exclusión por tamaños (Superdex 200, GE Healthcare) equilibrada con PBS.
- 25 El dominio A3B3 hCEACAM5 etiquetado con His (SEQ ID NO:67) se produjo con células HEK293-FS™ cultivadas en un matraz por transfección transitoria del plásmido de expresión. Cada día se añadió kifunensina (inhibidor del proceso de recorte en la glicosilación). El sobrenadante del cultivo que contiene la proteína segregada se recolectó siete días después de la transfección, se centrifugó y se filtró en una membrana de 0,22 µm. Se añadió endoH al sobrenadante hasta 625 u/ml, y después se incubó 3 h a 37°C. El A3B3 de hCEACAM5 desglucosilado se purificó por
- 30 cromatografía de afinidad en IMAC (HisTrap, GE Healthcare) usando gradiente de imidazol en PBS. Después, el conjunto de fracciones que contiene el A3B3 de hCEACAM5 desglucosilado se purificó por cromatografía de exclusión por tamaños (Superdex 200, GE Healthcare) equilibrada con PBS. El análisis por espectrometría de masas de A3B3 de hCEACAM5 desglucosilado mostró dos especies (22485 y 22278 Da), lo que indica que la proteína porta 7 u 8 restos de N-acetilglucosamina (GlcNAc).
- 35 Para construir un complejo, ambas proteínas se combinaron con un exceso de 1,5 moles de A3B3 de hCEACAM5 desglucosilado por un mol de Fab. Este exceso se eliminó por cromatografía de exclusión por tamaño en superdex 200 equilibrada con disolución salina amortiguada con fosfato. Las fracciones correspondientes a Fab en complejo con el antígeno se usaron para el estudio de intercambio de deuterio.

#### **Ejemplo 10.3: Métodos**

- 40 Los experimentos de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX) se automatizaron completamente usando un automuestreador PAL (CTC Analytics). Activó el inicio y la parada del intercambio, el control de la temperatura de proteólisis (4°C), la inyección de los péptidos deuterados, la gestión de las válvulas de inyección y de lavado, y desencadenó la adquisición de las bombas del espectrómetro de masas y HPLC. Una caja enfriada por efecto Peltier (4°C) contenía dos válvulas Rheodyne automatizadas (6 puertos para inyección y 10 puertos para lavado), un
- 45 cartucho de desalado (Micro Trap de péptidos de Bruker-Michrom) y una columna de HPLC (Poroshell 120 EC-C18, 1 x 50 mm, 2,7 µM de Agilent Technologies). La deuteración se inició por una dilución de 5 veces de CEACAM5, mAb o complejo con PBS en D<sub>2</sub>O. Se usó GndHCl 2M, TCEP 0,8 M, glicina 1 M para detener el retrointercambio y reducir los puentes de disulfuro durante 2 min. a 4°C.

- Las proteínas se digirieron con las proteasas pepsina y nepentesina, y los péptidos se desalaron usando una bomba de HPLC de Agilent Technologies con TFA 0,03% en agua a 100 µl/min. Los péptidos se separaron entonces usando otra bomba de HPLC de Agilent Technologies con un gradiente 15-100% de B en 20 min. (A: TFA 0,03% en agua; B: acetonitrilo 90%, TFA 0,03% en agua). Las masas de los péptidos se midieron usando un espectrómetro de masas TOF con electropulverización (Agilent 6210).

- 55 Los péptidos se identificaron por MS en tándem (MSMS), usando un Bruker APEX-Q FTMS (9,4 T) y un Bruker 12 T SolariX.

Los software Data Analysis (Bruker) y Mass Hunter (Agilent Technologies) se usaron para las adquisiciones de los datos. Data Analysis y Mascot (Matrix Science) se usaron para procesar los datos de MSMS. Los software Mass Hunter y HD Examiner (Sierra Analytics) se usaron para el procesamiento de los datos de HDX.

Los experimentos de HDX se repitieron al menos tres veces.

5 **Ejemplo 10.4: Resultados**

Identificación y selección de los péptidos

10 Los puentes de disulfuro permanecieron intactos durante la deuteración para mantener la información estructural relacionada con ellos. Para favorecer la proteólisis y la identificación de los péptidos, los puentes se redujeron con TCEP después de la etapa de paralización a pH bajo y temperatura baja. Usando MSMS después de la digestión del complejo CEACAM5-Fab fue posible identificar un gran número de péptidos que surgen de las tres cadenas de proteína. Después de los experimentos de HDX, solo se seleccionaron los que proporcionaron señales de buena calidad: 25, 30 y 20 péptidos del antígeno A3-B3 de CEACAM5, cadena pesada de Fab de MAb2\_VH1aVL1c y cadena ligera de MAb2\_VH1aVL1c, respectivamente. Estos péptidos abarcan 89%, 77% y 68% de las secuencias del antígeno A3-B3 de CEACAM5, cadena pesada de Fab de MAb2\_VH1aVL1c y cadena ligera de MAb2\_VH1aVL1c, respectivamente (Tabla 25). Las regiones no abarcadas de las cadenas de Fab están principalmente en sus partes C-terminales.

Tabla 25: Cobertura de secuencia con péptidos deuterados

Péptidos	Cobertura de la secuencia
CEACAM5-A3-B3	1-18; 1-22; 1-23; 1-19; 23-35; 36-51; 35-49; 50-70; 36-43; 44-51; 36-51; 36-49; 50-67; 37-49; 44-49; 59-67; 71-89; 93-107; 108-115; 128-143; 128-142; 143-157; 130-143; 130-142; 140-143; 163-186
Cadena pesada de Fab de MAb2_VH1aVL1c	1-6; 1-20; 1-19; 1-17; 1-18; 4-18; 5-20; 5-18; 24-29; 27-32; 27-29; 34-46; 47-68; 48-68; 50-68; 69-86; 84-93; 88-98; 92-104; 100-109; 110-115; 116-136; 111-128; 149-158; 151-158; 159-177; 162-177; 167-177; 187-206
Cadena ligera de MAb2_VH1aVL1c	1-11; 5-11; 22-46; 47-54; 55-70; 55-71; 72-82; 87-104; 105-115; 117-132; 124-131; 127-145; 133-144; 136-145; 136-143; 136-144; 143-161; 144-151; 146-151

20 Los 8 restos de asparagina que son sitios potenciales de glicosilaciones se identificaron en varios péptidos con una GlcNAc que queda de la deglicosilación con endo H. En particular, se encontró N114 en el péptido 108-115. En los primeros experimentos (no usados para HDX), se encontró N166 en ambas formas (con y sin GlcNAc). Podría explicar la heterogeneidad observada en el espectro de masas de A3B3 de CEACAM5 después de la glicosilación, que corresponde a 7 y 8 GlcNAc.

Identificación de epítipo y paratopo

25 El antígeno libre, el Fab libre y su complejo se deuteraron durante 2 min. o 20 min. a 4°C, o a 20 min. a temperatura ambiente (26°C). Considerando las cinéticas del intercambio de hidrógenos de amida con la temperatura (un incremento de intercambio de aproximadamente 3 veces con 10°C), la última condición es equivalente a 200 min. de deuteración a 4°C.

Epítipo

30 Las cinéticas de la incorporación de deuterio para los 25 péptidos seleccionados de A3B3 de CEACAM5 se compararon cuando el antígeno se deuteró en la forma libre y cuando estaba formando un complejo con el Fab. Varios péptidos no mostraron ninguna diferencia significativa en HDX ( $\Delta$ HDX) entre ambos estados. Por el contrario, algunos de ellos (108-115 y 128-143) mostraron  $\Delta$ HDX significativa. La segunda región estaba abarcada con 5 péptidos diferentes: 128-142, 128-143, 130-142, 130-143 y 140-143, que muestran  $13-15 \pm 2\%$  (hasta  $1,6 \pm 0,2$  D)  $\Delta$ HDX después de 2 min. de deuteración.

35 Comparando 128-142 con 130-142, y 128-143 con 130-143, no medimos ningún cambio significativo en  $\Delta$ HDX en cada caso (1,3-1,4 D para los dos primeros péptidos, y 1,6 para los dos últimos, después de 2 min. de deuteración), lo que significa que las amidas W129 y R130 probablemente no estén implicadas en el epítipo. Por el contrario, comparando 128-142 con 128-143, y 130-142 con 130-143, medimos un pequeño cambio en  $\Delta$ HDX (aproximadamente 0,2 D), lo que significa que la amida F143 está implicada. El  $\Delta$ HDX en el péptido 140-143 (aproximadamente 0,3 D) indica que las amidas V141 o L142 también podrían estar implicadas. Dentro de las 9 amidas de I131 a Q140, varias de ellas están implicadas en el epítipo (aproximadamente 1  $\Delta$ HDX compartido en promedio).

45 Estas diferencias en la incorporación de deuterio indican que el epítipo pertenece en particular a regiones (amidias), es decir, péptidos de secuencias SGANLNL (SEQ ID NO: 76) y INGIPQQHTQVLF (SEQ ID NO: 77).

Paratopo

5 Las cinéticas de la incorporación de deuterio para los 30 péptidos seleccionados de la cadena pesada de Fab se compararon cuando el Fab se deuteró en la forma libre y cuando estaba formando un complejo con el antígeno. Casi todos los péptidos no mostraron ninguna  $\Delta$ HDX significativa entre ambos estados. Solo un péptido (100-109) presentó una  $\Delta$ HDX después de 200 min. de deuteración:  $11 \pm 2\%$  ( $0,7 \pm 0,2$  D). La región (amidas) 101-109 de cadena pesada de Fab de MAb2\_VH1aVL1c está implicada en el paratopo.

10 Las cinéticas de la incorporación de deuterio para los 20 péptidos seleccionados de la cadena ligera de Fab se compararon cuando el Fab se deuteró en la forma libre y cuando estaba formando un complejo con el antígeno. Casi todos los péptidos no mostraron ninguna  $\Delta$ HDX significativa entre ambos estados. Solo dos péptidos (47-54 y 87-104) presentaron una diferencia. Después de 20 min. de deuteración, fue  $10 \pm 2\%$  ( $0,6 \pm 0,2$  D) para el primero y  $5 \pm 2\%$  ( $0,9 \pm 0,2$  D) para el segundo, respectivamente. Las regiones 48-54 y 88-104 de cadena ligera de MAb2\_VH1aVL1c están implicadas en el paratopo.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> SANOFI
- 15 <120> ANTICUERPOS ANTI-CEACAM5 Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> FR2012/065
- <150> EP12306444
- <151> 2012-11-20
- <160> 90
- 20 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CDR
- <400> 1
- Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
- 1 5
- 30 <210> 2
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> CDR
- <400> 2
- Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile
- 1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> CDR

<400> 3

Ala Arg Pro Ala Tyr Tyr Gly Asn Pro Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

10 <210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CDR

<400> 4

Gln Asn Val Gly Thr Asn  
1 5

<210> 5

20 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH1a del anticuerpo Mab2 humanizado

25 <400> 5

ES 2 778 823 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 6

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr  
1 5 10

10

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

<400> 7

Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr Asp  
1 5

20

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> CDR

<400> 8

Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr  
1 5

10 <210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR

<400> 9

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 10

20 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

25 <400> 10

Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
1 5

<210> 11

<211> 526

30 <212> PRT

<213> Homosapiens

<400> 11

ES 2 778 823 T3

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln  
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr  
 20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly  
 35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly  
 50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val  
 65 70 75 80

Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser  
 85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val  
 100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp  
 115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu  
 130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys  
 145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr  
 165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln  
 180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn  
 195 200 205

Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn  
 210 215 220

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro  
 225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser  
 245 250 255

ES 2 778 823 T3

Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu  
 260 265 270  
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn  
 275 280 285  
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser  
 290 295 300  
 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr  
 325 330 335  
 Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp  
 340 345 350  
 Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser  
 355 360 365  
 Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn  
 370 375 380  
 Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn  
 385 390 395 400  
 Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr  
 405 410 415  
 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly  
 420 425 430  
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu  
 435 440 445  
 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg  
 450 455 460  
 Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His  
 465 470 475 480  
 Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu  
 485 490 495  
 Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser  
 500 505 510  
 Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln  
 515 520 525

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> CDR

<400> 12

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 13

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

15 <400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala  
1 5

<210> 14

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

<400> 14

Ile Ser Ser Gly Gly Asp Thr  
1 5

25

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

<400> 15

ES 2 778 823 T3

Ala Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp  
1 5 10

<210> 16

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

<400> 16

Gln Asn Val Gly Thr Asn  
1 5

10

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL1 del anticuerpo Mab2 humanizado

<400> 17

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

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
85 90 95

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

20

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

5 <400> 18

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Tyr Thr

1

5

10

10 <210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CDR

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp  
1 5

<210> 20

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

25 <400> 20

Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Arg Thr  
1 5

<210> 21

<211> 13

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

ES 2 778 823 T3

<400> 21

Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 22

5 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

10 <400> 22

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
1 5

<210> 23

<211> 107

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL1a del anticuerpo Mab2 humanizado

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
85 90 95

20 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> CDR

<400> 24

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr  
1 5

<210> 25

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

15 <400> 25

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp  
1 5

<210> 26

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

<400> 26

Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr  
1 5

25

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

<400> 27

ES 2 778 823 T3

Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 28

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

<400> 28

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
1 5

10

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL1c del anticuerpo Mab2 humanizado

<400> 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val  
35 40 45

20

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
85 90 95

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

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> CDR

<400> 30

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 31

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

15 <400> 31

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Pro Ala Tyr Tyr Gly Asn Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

20 <210> 32

<211> 108

<212> PRT

ES 2 778 823 T3

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 32

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu  
85 90 95

5 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 33

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

15

ES 2 778 823 T3

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Phe Pro Asp Thr Val  
 50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 34

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 34

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
 85 90 95

10 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

ES 2 778 823 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 35

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Phe Leu  
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 36

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile  
35 40 45

15

ES 2 778 823 T3

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu  
85 90 95

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

<210> 37

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

10 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

ES 2 778 823 T3

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Ile Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

5 <210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> fragmento de anticuerpo

<400> 39

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Thr Tyr Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

ES 2 778 823 T3

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 40

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 40

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
85 90 95

10 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 41

<211> 449

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 41

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly



ES 2 778 823 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

<210> 42

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 42

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly



ES 2 778 823 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Phe Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile



ES 2 778 823 T3

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 45

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 45

ES 2 778 823 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Thr Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

ES 2 778 823 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 46

ES 2 778 823 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 47

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 47

ES 2 778 823 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Phe Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

ES 2 778 823 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

<210> 48

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 48

ES 2 778 823 T3

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Ile Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 49

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

<400> 49

ES 2 778 823 T3

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Thr Tyr Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

ES 2 778 823 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

<210> 50

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

ES 2 778 823 T3

<400> 50

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 51

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de anticuerpo

10 <400> 51

ES 2 778 823 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Phe Pro Ser Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 52

<211> 702

5 <212> PRT

<213> Homosapiens

<400> 52

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln  
1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr  
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly  
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly  
50 55 60

ES 2 778 823 T3

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser  
 85 90 95  
 Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile  
 100 105 110  
 Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp  
 115 120 125  
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu  
 130 135 140  
 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys  
 145 150 155 160  
 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr  
 165 170 175  
 Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln  
 180 185 190  
 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn  
 195 200 205  
 Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg  
 210 215 220  
 Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro  
 225 230 235 240  
 Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn  
 245 250 255  
 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe  
 260 265 270  
 Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn  
 275 280 285  
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser  
 290 295 300  
 Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala



ES 2 778 823 T3

Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser  
565 570 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly  
580 585 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly  
595 600 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln  
610 615 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu  
625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe  
645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile  
660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr  
675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile  
690 695 700

<210> 53

<211> 654

5 <212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 53

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile  
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys  
35 40 45

Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg  
50 55 60

Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln  
65 70 75 80

ES 2 778 823 T3

Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu Asp Leu Val  
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
100 105 110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala  
115 120 125

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp  
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser  
145 150 155 160

Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr  
165 170 175

Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser  
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile  
195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr  
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn  
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr  
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr  
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Glu Leu  
275 280 285

Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys  
290 295 300

Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr  
305 310 315 320

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg Leu Glu  
325 330 335

ES 2 778 823 T3

Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn  
 340 345 350

Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg  
 355 360 365

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro  
 370 375 380

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn Leu Asn  
 385 390 395 400

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe Trp Phe  
 405 410 415

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn  
 420 425 430

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser  
 435 440 445

Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Val  
 450 455 460

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu  
 465 470 475 480

Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr  
 485 490 495

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg  
 500 505 510

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr  
 515 520 525

Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Ser Glu Ser  
 530 535 540

Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp  
 545 550 555 560

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser Gly Ala Asn  
 565 570 575

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser  
 580 585 590

ES 2 778 823 T3

Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile  
595 600 605

Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser  
610 615 620

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val  
625 630 635 640

Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala  
645 650

<210> 54

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo

<400> 54

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
85 90 95

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

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

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

10

ES 2 778 823 T3

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 55

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo

<400> 55

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

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val  
 35 40 45

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
 85 90 95

10 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 56

<211> 418

<212> PRT

15 <213> Homosapiens

<220>

ES 2 778 823 T3

<221> DOMINIO

<222> (1)..(394)

<223> dominio extracelular de CEACAM1 humana

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (395)..(418)

<223> extensión con etiqueta de His

<400> 56

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser  
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr  
35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg  
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln  
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val  
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala  
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp  
130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser  
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr  
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser  
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile



ES 2 778 823 T3

<223> dominio extracelular de CEACAM1 de mono macaco

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (395)..(418)

5 <223> extensión con etiqueta de His

<400> 57

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Ser Gln Asn Leu Ile Gly Tyr Asn  
20 25 30

Trp His Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Lys Arg Leu Ile Val Ala Tyr  
35 40 45

Val Ile Glu Thr Lys Gln Thr Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg  
50 55 60

Glu Met Ile Tyr Ser Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln  
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Gly Asp Leu Val  
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
100 105 110

Pro Asn Ile Thr Ile Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Val  
115 120 125

Val Thr Phe Thr Cys Glu Ser Glu Ala Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp  
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Ser Arg Leu Gln Leu Ser  
145 150 155 160

Asn Gly Asn Lys Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Leu Arg Asn Asp Thr  
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser  
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile



ES 2 778 823 T3

<223> dominio extracelular de CEACAM5 humana

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (652)..(675)

5 <223> extensión con etiqueta de His

<400> 58

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser  
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr  
35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg  
50 55 60

Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln  
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val  
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala  
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp  
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser  
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr  
165 170 175

Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser  
180 185 190

Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile

ES 2 778 823 T3

195	200	205																							
Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser										
210						215					220														
Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Phe	Val	Asn										
225					230					235					240										
Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr										
				245					250					255											
Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	Asp	Thr										
			260					265					270												
Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Glu	Pro										
		275					280					285													
Pro	Lys	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Glu										
	290					295					300														
Asp	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Ile	Gln	Asn	Thr	Thr	Tyr										
305					310					315					320										
Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln										
				325					330					335											
Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Arg	Asn										
		340						345					350												
Asp	Val	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Glu	Leu	Ser	Val	Asp										
		355					360					365													
His	Ser	Asp	Pro	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Asp	Pro										
	370					375					380														
Thr	Ile	Ser	Pro	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Gly	Val	Asn	Leu	Ser										
385					390					395					400										
Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Leu										
				405					410					415											
Ile	Asp	Gly	Asn	Ile	Gln	Gln	His	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Ser	Asn										
			420					425					430												
Ile	Thr	Glu	Lys	Asn	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	Asn	Asn	Ser										
		435					440					445													

ES 2 778 823 T3

Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala  
450 455 460

Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu  
465 470 475 480

Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr  
485 490 495

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg  
500 505 510

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr  
515 520 525

Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser  
530 535 540

Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp  
545 550 555 560

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn  
565 570 575

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser  
580 585 590

Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile  
595 600 605

Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser  
610 615 620

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val  
625 630 635 640

Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser  
645 650 655

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His  
660 665 670

His His His  
675

<210> 59

<211> 678

5 <212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<221> DOMINIO

ES 2 778 823 T3

<222> (1)..(654)

<223> dominio extracelular de CEACAM5 de mono macaco

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

5 <222> (655)..(678)

<223> extensión con etiqueta de His

<400> 59

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile  
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys  
35 40 45

Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg  
50 55 60

Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln  
65 70 75 80

Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu Asp Leu Val  
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
100 105 110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala  
115 120 125

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp  
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser  
145 150 155 160

Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr  
165 170 175

Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser  
180 185 190

ES 2 778 823 T3

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile  
 195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr  
 210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn  
 225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr  
 245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr  
 260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Glu Leu  
 275 280 285

Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys  
 290 295 300

Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr  
 305 310 315 320

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg Leu Glu  
 325 330 335

Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn  
 340 345 350

Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg  
 355 360 365

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro  
 370 375 380

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn Leu Asn  
 385 390 395 400

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe Trp Phe  
 405 410 415

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn  
 420 425 430

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser  
 435 440 445

ES 2 778 823 T3

Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Val  
450 455 460

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu  
465 470 475 480

Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr  
485 490 495

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg  
500 505 510

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr  
515 520 525

Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Ser Glu Ser  
530 535 540

Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp  
545 550 555 560

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser Gly Ala Asn  
565 570 575

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser  
580 585 590

Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile  
595 600 605

Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser  
610 615 620

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val  
625 630 635 640

Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala Ser Gly  
645 650 655

Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp  
660 665 670

His His His His His His  
675

<210> 60

<211> 317

5 <212> PRT

<213> Homosapiens

<220>

<221> DOMINIO

ES 2 778 823 T3

<222> (1)..(293)

<223> dominio extracelular de CEACAM6 humana

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

5 <222> (294)..(317)

<223> extensión con etiqueta de His

<400> 60

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Arg Ile Gly Tyr Ser  
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Ser Leu Ile Val Gly Tyr  
 35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg  
 50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln  
 65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val  
 85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
 100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala  
 115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Val Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp  
 130 135 140

Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser  
 145 150 155 160

Asn Gly Asn Met Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn Asp Ala  
 165 170 175

Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn Arg Ser  
 180 185 190

ES 2 778 823 T3

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Gly Pro Thr Ile  
 195 200 205

Ser Pro Ser Lys Ala Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser  
 210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Ile Asn  
 225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr  
 245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr  
 260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Met Ile Thr Val Ser Gly Ser Ala  
 275 280 285

Pro Val Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe  
 290 295 300

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His His His  
 305 310 315

<210> 61

<211> 317

5 <212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(293)

10 <223> dominio extracelular de CEACAM6 de mono macaco

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (294)..(317)

<223> extensión con etiqueta de His

15 <400> 61

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Thr Leu Gly Phe Asn  
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Lys Arg Leu Ile Val Ala Tyr  
 35 40 45

ES 2 778 823 T3

Val Ile Gly Thr Gln Gln Thr Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg  
50 55 60

Glu Met Ile Tyr Ser Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln  
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Gly Asp Leu Val  
85 90 95

Thr Glu Glu Ala Thr Gly Arg Phe Trp Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
100 105 110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala  
115 120 125

Val Asp Phe Thr Cys Glu Pro Asp Ile His Ser Thr Thr Tyr Leu Trp  
130 135 140

Trp Val Asn Asp Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser  
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn Asp Ala  
165 170 175

Gly Ala Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Leu Ser  
180 185 190

Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile  
195 200 205

Ser Pro Ser Asn Ser Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser  
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn  
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr  
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala Tyr Asn Ser Ala Thr  
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Met Met Ile Thr Val Ser Gly Ser Ala  
275 280 285

Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe  
290 295 300

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His His His  
305 310 315

ES 2 778 823 T3

<211> 322

<212> PRT

<213> Homosapiens

<220>

5 <221> DOMINIO

<222> (1)..(298)

<223> dominio extracelular de CEACAM8 humana

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

10 <222> (299)..(322)

<223> extensión con etiqueta de His

<400> 62

```

Gln Leu Thr Ile Glu Ala Val Pro Ser Asn Ala Ala Glu Gly Lys Glu
1           5           10           15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Asp Pro Arg Gly Tyr Asn
20           25           30

Trp Tyr Lys Gly Glu Thr Val Asp Ala Asn Arg Arg Ile Ile Gly Tyr
35           40           45

Val Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Asn Arg
50           55           60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Met Arg Asn Val Thr Arg
65           70           75           80

Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Leu Asn Leu Met
85           90           95

Ser Glu Glu Val Thr Gly Gln Phe Ser Val His Pro Glu Thr Pro Lys
100          105          110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115          120          125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp
130          135          140

Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145          150          155          160
    
```

ES 2 778 823 T3

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Val  
 165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn Phe Ser  
 180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile  
 195 200 205

Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr His Ala Gly Val Asn Leu Asn Leu Ser  
 210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ser Gln Tyr Ser Trp Ser Val Asn  
 225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Tyr Thr Gln Lys Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr  
 245 250 255

Thr Lys Asn Ser Gly Ser Tyr Ala Cys His Thr Thr Asn Ser Ala Thr  
 260 265 270

Gly Arg Asn Arg Thr Thr Val Arg Met Ile Thr Val Ser Asp Ala Leu  
 275 280 285

Val Gln Gly Ser Ser Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 290 295 300

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His  
 305 310 315 320

His His

<210> 63

<211> 322

5 <212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(298)

10 <223> dominio extracelular de CEACAM8 de mono macaco

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (299)..(322)

<223> extensión con etiqueta de His

15 <400> 63

Gln Leu Thr Ile Glu Ala Val Pro Ser Asn Ala Ala Glu Gly Lys Glu



ES 2 778 823 T3

Ala Lys Asn Ser Gly Ser Tyr Ala Cys His Ala Thr Asn Ser Ala Thr  
 260 265 270

Gly His Asn Gly Thr Thr Val Arg Met Ile Thr Val Ser Asp Ala Ser  
 275 280 285

Val Gln Gly Ser Ser Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 290 295 300

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His  
 305 310 315 320

His His

<210> 64

<211> 237

5 <212> PRT

<213> Homosapiens

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(213)

10 <223> dominio extracelular de CEACAM7 humana

<220>

<221> DOMINIO

<222> (214)..(237)

<223> extensión con etiqueta de His

15 <400> 64

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

Leu Leu Val Val His Asn Glu Ser Gln Asn Leu Tyr Gly Tyr Asn Trp  
 20 25 30

Tyr Lys Gly Glu Arg Val His Ala Asn Tyr Arg Ile Ile Gly Tyr Val  
 35 40 45

Lys Asn Ile Ser Gln Glu Asn Ala Pro Gly Pro Ala His Asn Gly Arg  
 50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Gly Thr Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr His  
 65 70 75 80

Asn Asp Ala Gly Ile Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Glu Asn Leu Val  
 85 90 95

Asn Glu Glu Val Thr Arg Gln Phe Tyr Val Phe Ser Glu Pro Pro Lys

ES 2 778 823 T3

100

105

110

Pro Ser Ile Thr Ser Asn Asn Phe Asn Pro Val Glu Asn Lys Asp Ile  
115 120 125

Val Val Leu Thr Cys Gln Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp  
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Leu Val Ser Pro Arg Leu Leu Leu Ser  
145 150 155 160

Thr Asp Asn Arg Thr Leu Val Leu Leu Ser Ala Thr Lys Asn Asp Ile  
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Gly Ala Ser Arg Ser  
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Arg Tyr Glu Ser Val Gln Ala Ser Ser  
195 200 205

Pro Asp Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe  
210 215 220

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His His His  
225 230 235

<210> 65

<211> 292

5 <212> PRT

<213> Homosapiens

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (286)

10 <223> N-A1-B1 de hCEACAM5

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (287)..(292)

<223> etiqueta de His

15 <400> 65

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser  
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr  
35 40 45

ES 2 778 823 T3

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg  
50 55 60

Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln  
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val  
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala  
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp  
130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser  
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr  
165 170 175

Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser  
180 185 190

Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile  
195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser  
210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn  
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr  
245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr  
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala His His  
275 280 285

His His His His

290

5 <210> 66  
<211> 184  
<212> PRT

ES 2 778 823 T3

<213> Homosapiens

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(178)

5 <223> A2-B2 de hCEACAM5

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (179)..(184)

<223> etiqueta de His

10 <400> 66

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

Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr  
20 25 30

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg  
35 40 45

Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr  
50 55 60

Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser  
65 70 75 80

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp  
85 90 95

Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn  
100 105 110

Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser  
115 120 125

Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile  
130 135 140

Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn  
145 150 155 160

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val  
165 170 175

Ser Ala His His His His His His  
180

15 <210> 67

ES 2 778 823 T3

<211> 193

<212> PRT

<213> Homosapiens

<220>

5 <221> DOMINIO

<222> (1)..(187)

<223> A3-B3 de hCEACAM5

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

10 <222> (188)..(193)

<223> etiqueta de His

<400> 67

```

Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
1          5          10          15

Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr
20          25          30

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
35          40          45

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
50          55          60

Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser
65          70          75          80

Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
85          90          95

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn
100         105         110

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
115         120         125

Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
130         135         140

Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser
145         150         155         160

```

ES 2 778 823 T3

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val  
 165 170 175

Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala His His His His His  
 180 185 190

His

<210> 68

<211> 310

5 <212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (286)

10 <223> dominio N-A1-B1 de CEACAM5 de mono macaco

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (287)..(310)

<223> extensión con etiqueta de His

15 <400> 68

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu  
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile  
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys  
 35 40 45

Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg  
 50 55 60

Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln  
 65 70 75 80

Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu Asp Leu Val  
 85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys  
 100 105 110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala  
 115 120 125

ES 2 778 823 T3

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp  
 130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser  
 145 150 155 160

Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr  
 165 170 175

Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser  
 180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile  
 195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr  
 210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn  
 225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr  
 245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr  
 260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Ser Gly  
 275 280 285

Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp  
 290 295 300

His His His His His His  
 305 310

<210> 69

<211> 202

5 <212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(178)

10 <223> dominio A2-B2 de CEACAM5 de mono macaco

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (179)..(202)

<223> extensión con etiqueta de His

ES 2 778 823 T3

<400> 69

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr  
 20 25 30  
 Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg  
 35 40 45  
 Leu Glu Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro  
 50 55 60  
 Arg Asn Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser  
 65 70 75 80  
 Val Arg Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp  
 85 90 95  
 Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn  
 100 105 110  
 Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe  
 115 120 125  
 Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile  
 130 135 140  
 Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val  
 165 170 175  
 Tyr Val Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln  
 180 185 190  
 Lys Ile Glu Trp His His His His His His  
 195 200

<210> 70

5 <211> 214

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> DOMINIO

10 <222> (1)..(190)

<223> dominio A3-B3 de CEACAM5 de mono macaco

<220>

ES 2 778 823 T3

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (191)..(214)

<223> extensión con etiqueta de His

<400> 70

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu  
1 5 10 15

Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr  
20 25 30

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg  
35 40 45

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr  
50 55 60

Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Ser Glu Ser  
65 70 75 80

Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp  
85 90 95

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser Gly Ala Asn  
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser  
115 120 125

Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile  
130 135 140

Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser  
145 150 155 160

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val  
165 170 175

Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala Ser Gly  
180 185 190

Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp  
195 200 205

5 His His His His His His

210

<210> 71

<211> 344

10 <212> PRT

ES 2 778 823 T3

<213> Homosapiens

<400> 71

Met Gly Pro Pro Ser Ala Pro Pro Cys Arg Leu His Val Pro Trp Lys  
1 5 10 15

Glu Val Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr  
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly  
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Arg Ile Gly  
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Ser Leu Ile Val  
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser  
85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val  
100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp  
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu  
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys  
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Val Gln Asn Thr Thr Tyr  
165 170 175

Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln  
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Met Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn  
195 200 205

Asp Ala Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn

ES 2 778 823 T3

210 215 220

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Gly Pro  
 225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Ser Lys Ala Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu Asn  
 245 250 255

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe  
 260 265 270

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn  
 275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser  
 290 295 300

Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Met Ile Thr Val Ser Gly  
 305 310 315 320

Ser Ala Pro Val Leu Ser Ala Val Ala Thr Val Gly Ile Thr Ile Gly  
 325 330 335

Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile  
 340

<210> 72

<211> 265

5 <212> PRT

<213> Homosapiens

<400> 72

Met Gly Ser Pro Ser Ala Cys Pro Tyr Arg Val Cys Ile Pro Trp Gln  
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Leu Pro Asn  
 20 25 30

Ser Ala Gln Thr Asn Ile Asp Val Val Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly  
 35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Val Val His Asn Glu Ser Gln Asn Leu Tyr Gly  
 50 55 60

Tyr Asn Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val His Ala Asn Tyr Arg Ile Ile  
 65 70 75 80

Gly Tyr Val Lys Asn Ile Ser Gln Glu Asn Ala Pro Gly Pro Ala His

ES 2 778 823 T3

85 90 95

Asn Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Gly Thr Leu Leu Ile Gln Asn  
100 105 110

Val Thr His Asn Asp Ala Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Glu  
115 120 125

Asn Leu Val Asn Glu Glu Val Thr Arg Gln Phe Tyr Val Phe Ser Glu  
130 135 140

Pro Pro Lys Pro Ser Ile Thr Ser Asn Asn Phe Asn Pro Val Glu Asn  
145 150 155 160

Lys Asp Ile Val Val Leu Thr Cys Gln Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr  
165 170 175

Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Leu Val Ser Pro Arg Leu  
180 185 190

Leu Leu Ser Thr Asp Asn Arg Thr Leu Val Leu Leu Ser Ala Thr Lys  
195 200 205

Asn Asp Ile Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Gly Ala  
210 215 220

Ser Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Arg Tyr Glu Ser Val Gln  
225 230 235 240

Ala Ser Ser Pro Asp Leu Ser Ala Gly Thr Ala Val Ser Ile Met Ile  
245 250 255

Gly Val Leu Ala Gly Met Ala Leu Ile  
260 265

<210> 73

<211> 349

5 <212> PRT

<213> Homosapiens

<400> 73

Met Gly Pro Ile Ser Ala Pro Ser Cys Arg Trp Arg Ile Pro Trp Gln  
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Phe Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr  
20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Ile Glu Ala Val Pro Ser Asn Ala Ala Glu Gly



ES 2 778 823 T3

Ile Thr Thr Lys Asn Ser Gly Ser Tyr Ala Cys His Thr Thr Asn Ser  
 290 295 300

Ala Thr Gly Arg Asn Arg Thr Thr Val Arg Met Ile Thr Val Ser Asp  
 305 310 315 320

Ala Leu Val Gln Gly Ser Ser Pro Gly Leu Ser Ala Arg Ala Thr Val  
 325 330 335

Ser Ile Met Ile Gly Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile  
 340 345

<210> 74

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MAb2\_VHg2

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

10 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 75

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 778 823 T3

<223> MAb2\_VLg5

<400> 75

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
85 90 95

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

5 <210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> restos de las posiciones 109-115 de CEACAM5-A3B3 humana

<400> 76

Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu  
1 5

<210> 77

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> restos de las posiciones 131-143 de CEACAM5-A3B3 humana

20 <400> 77

Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe  
1 5 10

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> CDR

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (3)..(3)

10 <223> Xaa es T, A o V

<400> 78

Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr Asp  
1 5

<210> 79

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR

20 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es S o N (en particular S)

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es Y o G (en particular G)

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

30 <222> (7)..(7)

<223> Xaa es R o I (en particular I)

<400> 79

Ile Xaa Ser Xaa Gly Gly Xaa Thr  
1 5

<210> 80  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> CDR  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (1)..(1)

10 <223> Xaa es A o T (en particular A)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa es T o S (en particular S)

15 <400> 80

Xaa	Ala	His	Tyr	Phe	Gly	Xaa	Ser	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr
1				5					10			

<210> 81  
 <211> 8

20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDR  
 <220>

25 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es R o S, en particular S  
 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

30 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es A o D  
 <400> 81

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Xaa	Tyr	Xaa
1				5			

<210> 82  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> CDR  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (6)..(6)  
 10 <223> Xaa está ausente, S o G (en particular G)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa es D, Y o I  
 15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es T o I (en particular T)  
 <400> 82  
  
 Ile Ser Ser Gly Gly Xaa Xaa Xaa  
 1 5  
 20  
  
 <210> 83  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDR  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 30 <222> (1)..(6)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido  
 <400> 83  
  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Asp  
 1 5

<210> 84  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> CDR  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Xaa es cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es A o S  
 15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es Y, F o W  
 <220>  
 20 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (7)..(8)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 25 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (13)..(13)  
 30 <223> Xaa es cualquier aminoácido  
 <400> 84  
 Xaa Xaa His Xaa Phe Gly Xaa Xaa Gly Pro Xaa Ala Xaa  
 1 5 10  
 <210> 85  
 35 <211> 6  
 <212> PRT

- <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDR  
 <220>
- 5 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (1)..(3)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
- 10 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es Y, F o W  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (5)..(5)
- 15 <223> Xaa es cualquier aminoácido  
 <400> 85
- |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |
- <210> 86
- 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDR
- 25 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido  
 <220>
- 30 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es Y, F o W  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
- 35 <222> (5)..(6)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

<222> (8)..(9)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

5 <400> 86

Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa  
1 5

<210> 87

<211> 449

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cadena pesada de huMAb2-3

<400> 87

ES 2 778 823 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

ES 2 778 823 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

5

<210> 88

<211> 214

<212> PRT

ES 2 778 823 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cadena ligera de huMAb2-3

<400> 88

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe  
85 90 95

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

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

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

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

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

5

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 89

10

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 778 823 T3

<220>

<223> VH1-IgG1 de cadena pesada de Mab2

<400> 89

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Phe Pro Ser Thr Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

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

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

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

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

ES 2 778 823 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

ES 2 778 823 T3

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> VL1d de cadena ligera de Mab2

<400> 90

```

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

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
          20          25          30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
          35          40          45

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
          85          90          95

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205

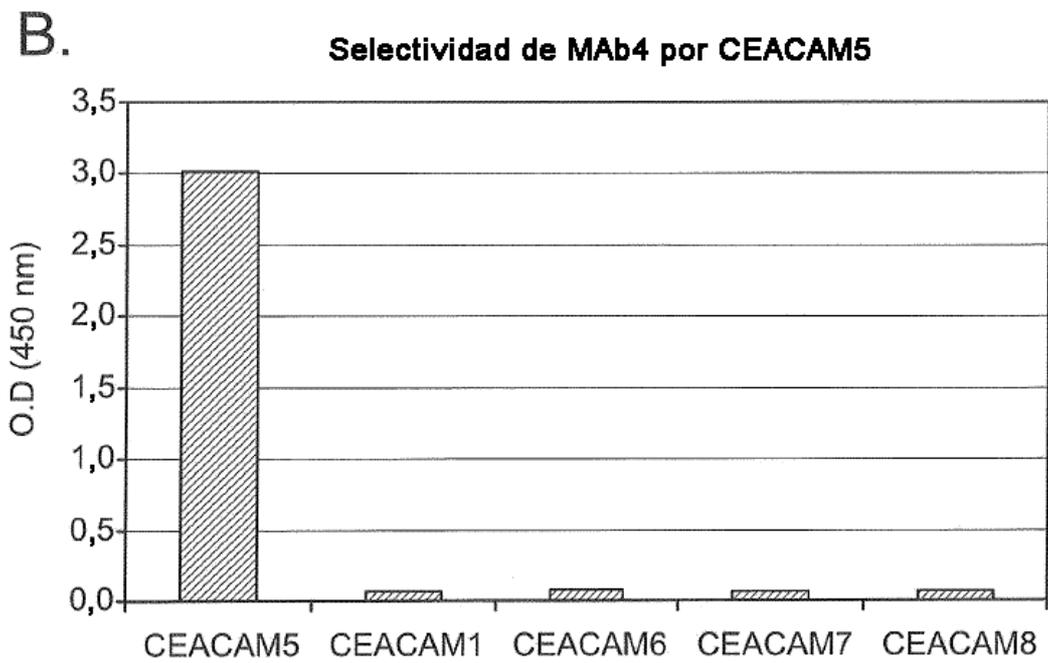
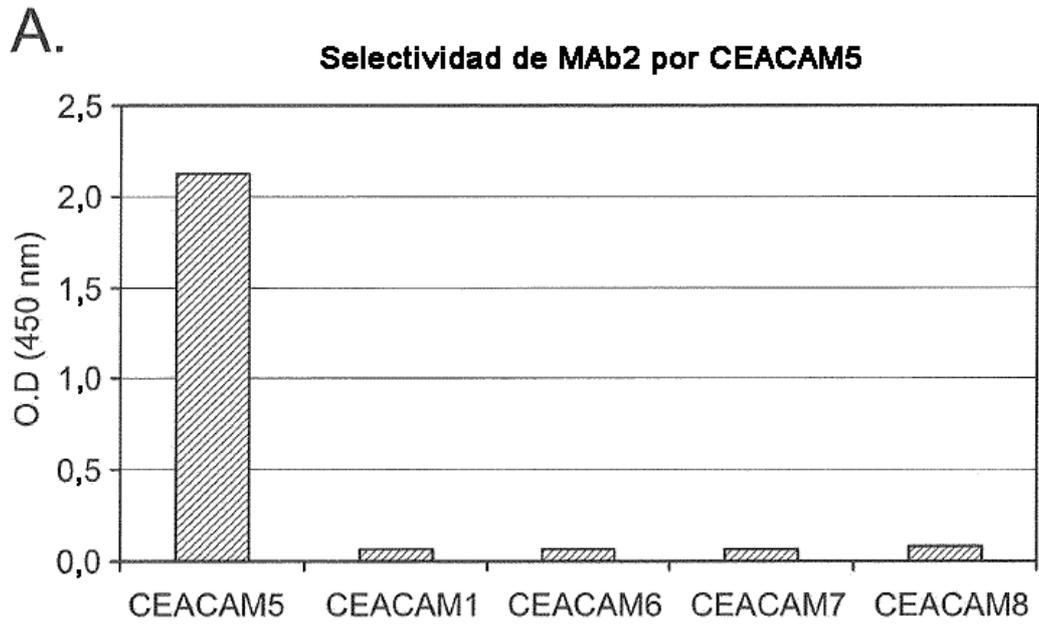
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
    
```

10

## REIVINDICACIONES

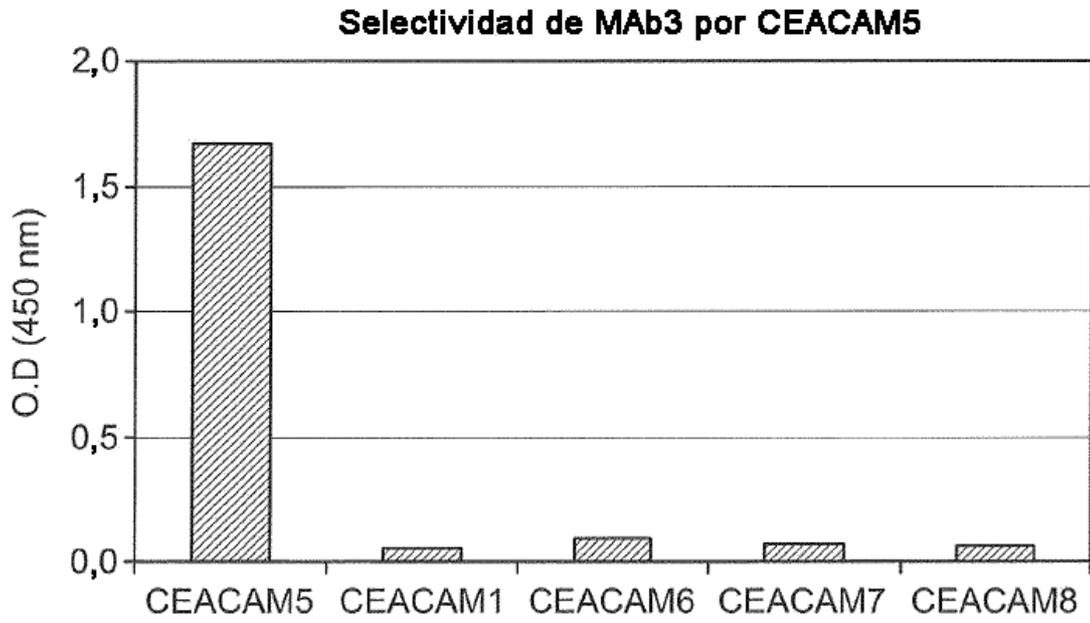
- 5 1. Un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia SEQ ID NO: 5, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, una CDR1-H de secuencia SEQ ID NO:7, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO:8, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO:9, y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia SEQ ID NO: 29, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, una CDR1-L de secuencia SEQ ID NO:10, una CDR2-L de secuencia NTR, y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO:12.
- 10 2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia SEQ ID NO: 5, o una secuencia al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a ésta.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia SEQ ID NO: 29, o una secuencia al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a ésta.
- 15 4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO:87, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y una cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO:88, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta.
5. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Una célula hospedante que se ha transformado por un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, conjugado o enlazado a al menos un agente inhibidor del crecimiento.
8. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho agente inhibidor del crecimiento es un agente citotóxico o un isótopo radioactivo.
- 25 9. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que dicho agente inhibidor del crecimiento se selecciona del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos, enzimas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas que son moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas, taxoides, vincas, taxanos, maitansinoide o análogos de maitansinoides, derivados de tomamicina o pirrolbenzodiazepina, derivados de criptoficina, derivados de leptomicina, análogos de auristatina o dolastatina, profármacos, inhibidores de la topoisomerasa II, agentes alquilantes de ADN, agentes anti-tubulina, y CC-1065 o análogos CC-1065.
- 30 10. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicho agente inhibidor del crecimiento es (N<sup>2</sup>'-desacetil-N<sup>2</sup>'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina) DM1 o N<sup>2</sup>'-desacetil-N-2'(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4).
- 35 11. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el anticuerpo está unido covalentemente mediante un enlazador escindible o no escindible a al menos un agente inhibidor del crecimiento.
12. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho enlazador se selecciona del grupo que consiste en piridilditiobutirato de N-succinimidilo (SPDB), ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfo-butírico (sulfo-SPDB), y (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC).
- 40 13. El inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el anticuerpo está enlazado covalentemente mediante piridilditiobutirato de N-succinimidilo (SPDB) a N<sup>2</sup>'-desacetil-N-2'(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4).
- 45 14. Un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO:87 y una cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO:88, y está enlazado covalentemente mediante piridilditiobutirato de N-succinimidilo (SPDB) a N<sup>2</sup>'-desacetil-N-2'(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM4).
15. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 16. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, para uso para el tratamiento de cáncer.

17. Un anticuerpo o un inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el cáncer es cáncer colorrectal, de estómago, gástrico, o de pulmón.
- 5 18. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, método el cual comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula hospedante transformada de acuerdo con la reivindicación 6; (ii) expresar dicho anticuerpo o polipéptido; y (iii) recuperar el anticuerpo o polipéptido expresado.
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho anticuerpo se separa adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas.
- 10 20. Un método para producir un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, que comprende las etapas de: (i) poner en contacto una disolución acuosa opcionalmente amortiguada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con disoluciones de un enlazador y un compuesto citotóxico, y (ii) después, separar opcionalmente el conjugado que se ha formado en (i) del anticuerpo que no ha reaccionado.
- 15 21. Un método para producir un inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 20, en el que, después de la etapa (i) o (ii), la disolución que contiene el conjugado puede someterse a una etapa adicional (iii) de cromatografía, ultrafiltración y/o diafiltración.
- 20 22. Un método para preparar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u obtenido mediante un método de acuerdo con las reivindicaciones 18 o 19, o un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 u obtenido mediante un método de acuerdo con las reivindicaciones 20 o 21, en el que una cantidad eficaz de dicho anticuerpo o de dicho inmunoconjugado se disuelve o dispersa en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

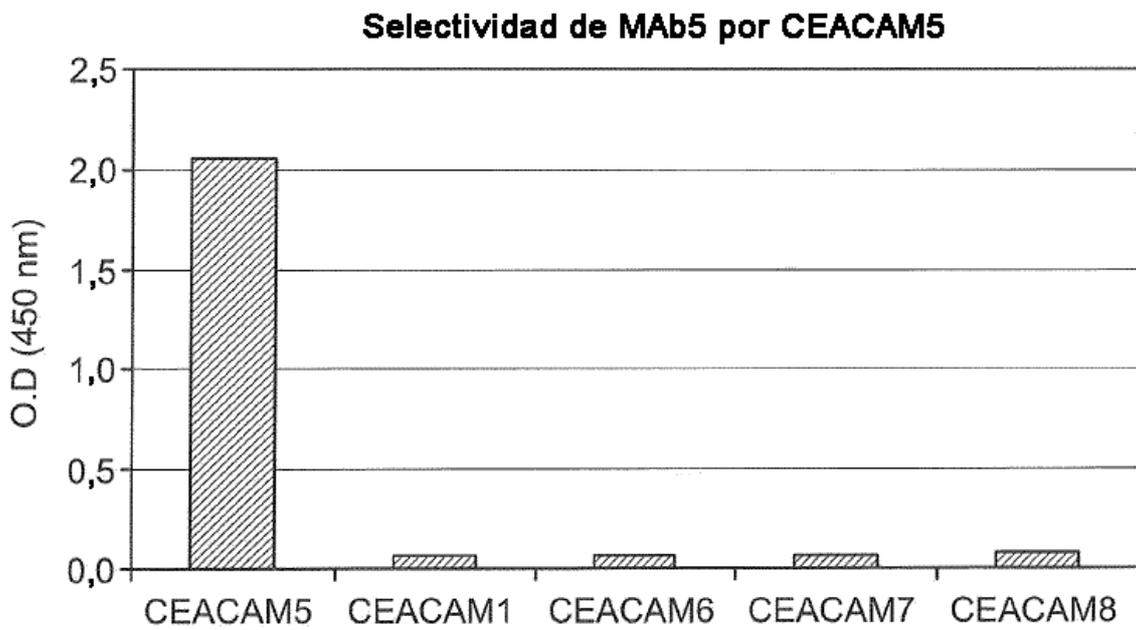


**FIG.1** Comienzo

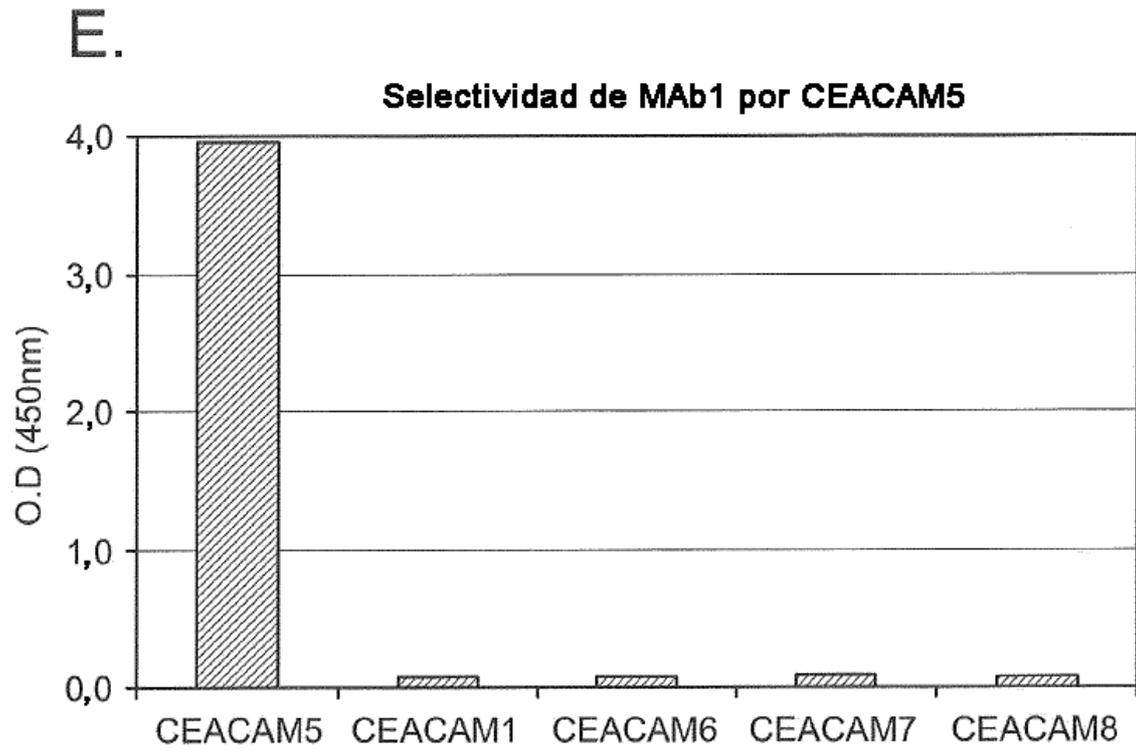
C.



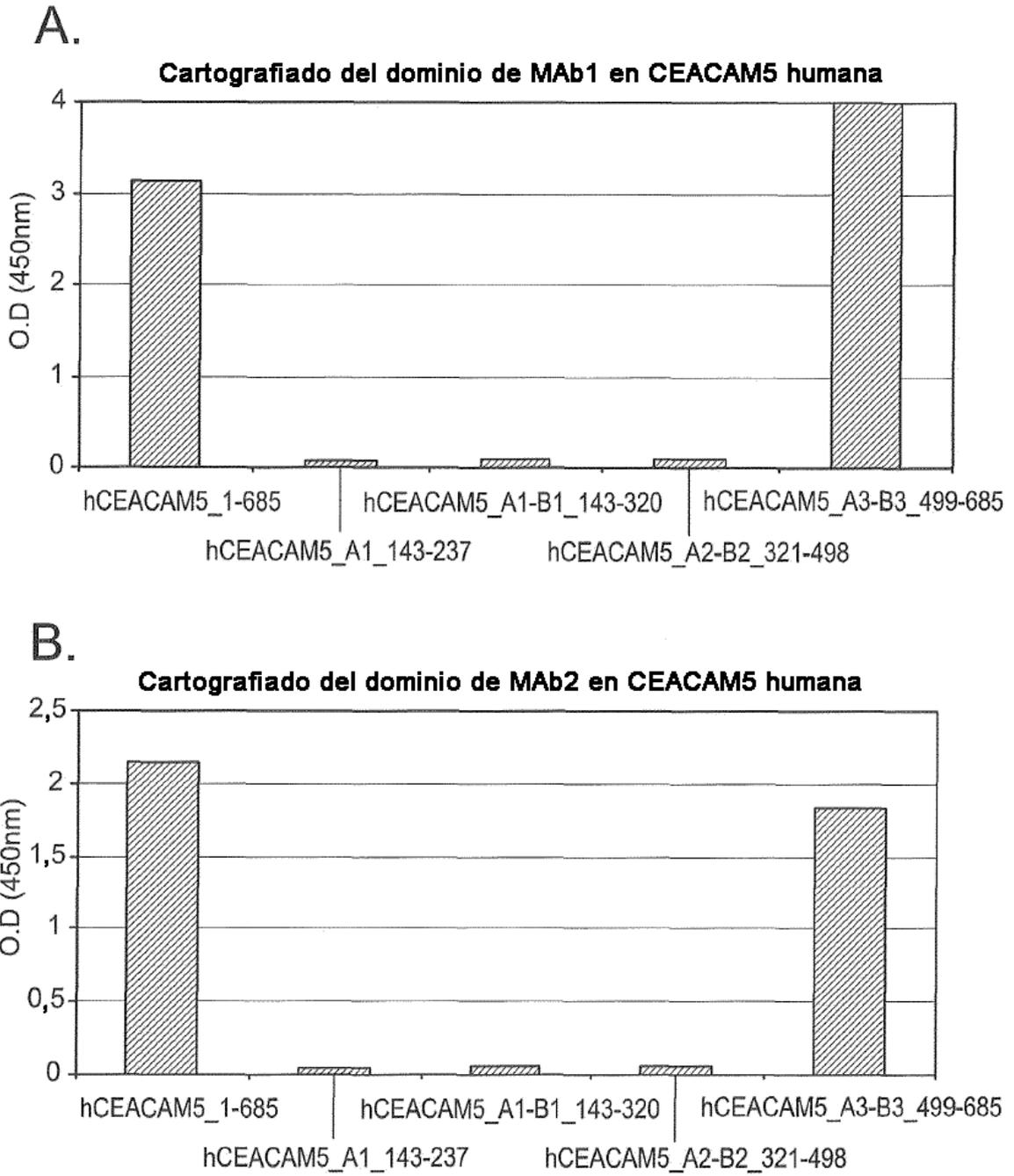
D.



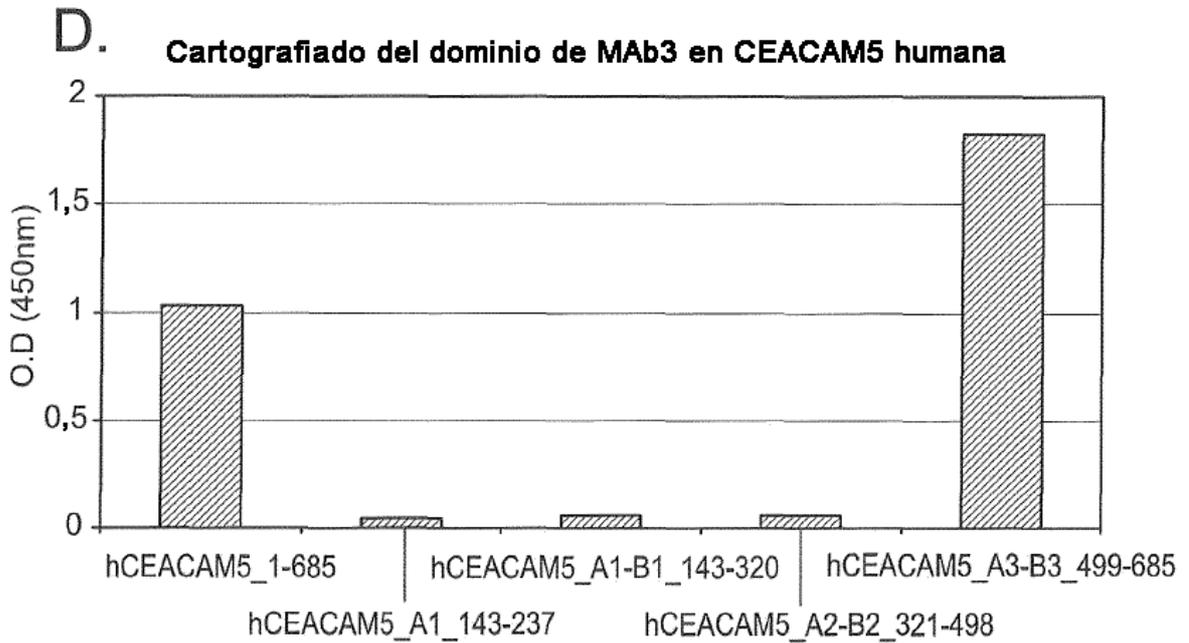
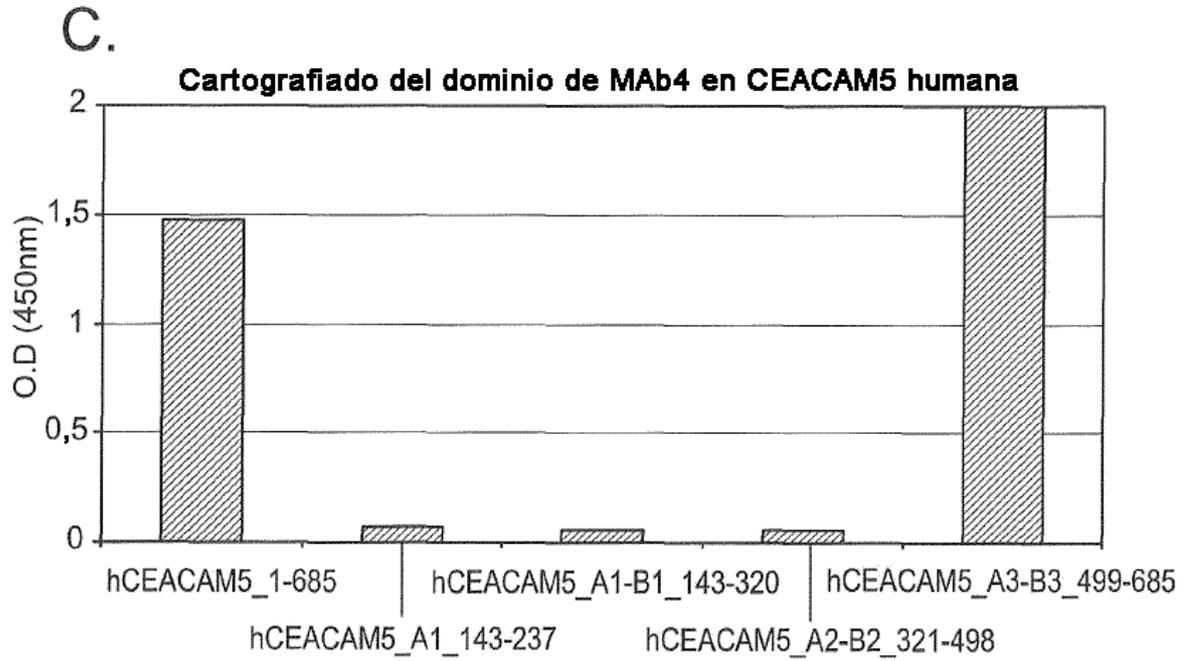
**FIG.1** Continuación



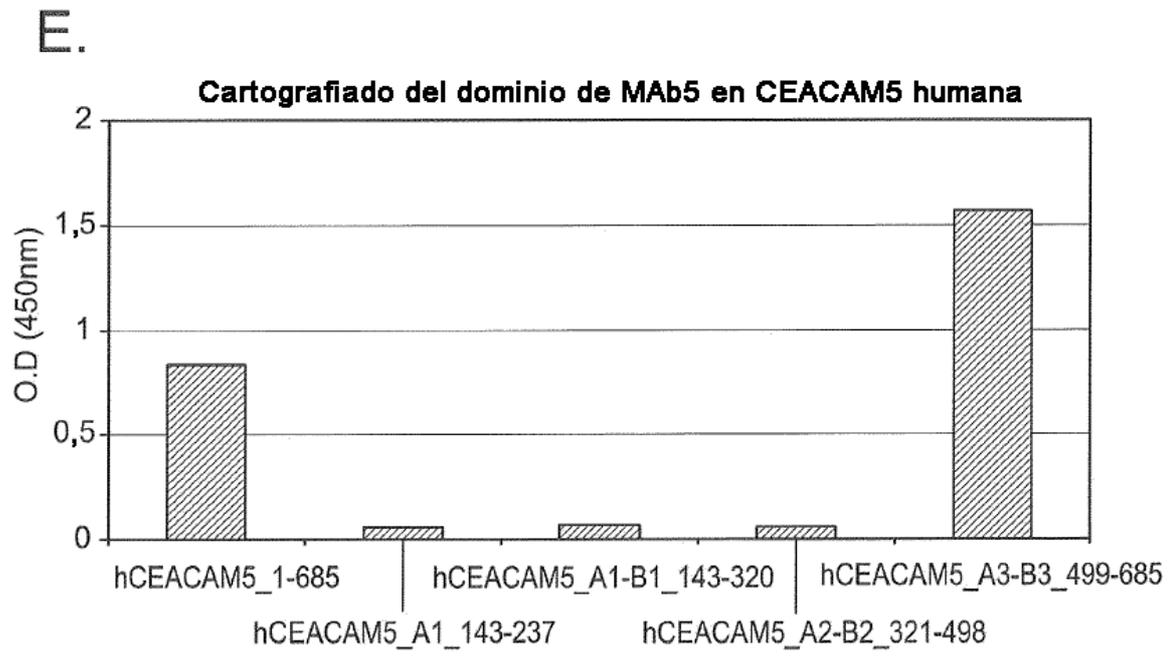
**FIG.1** Final



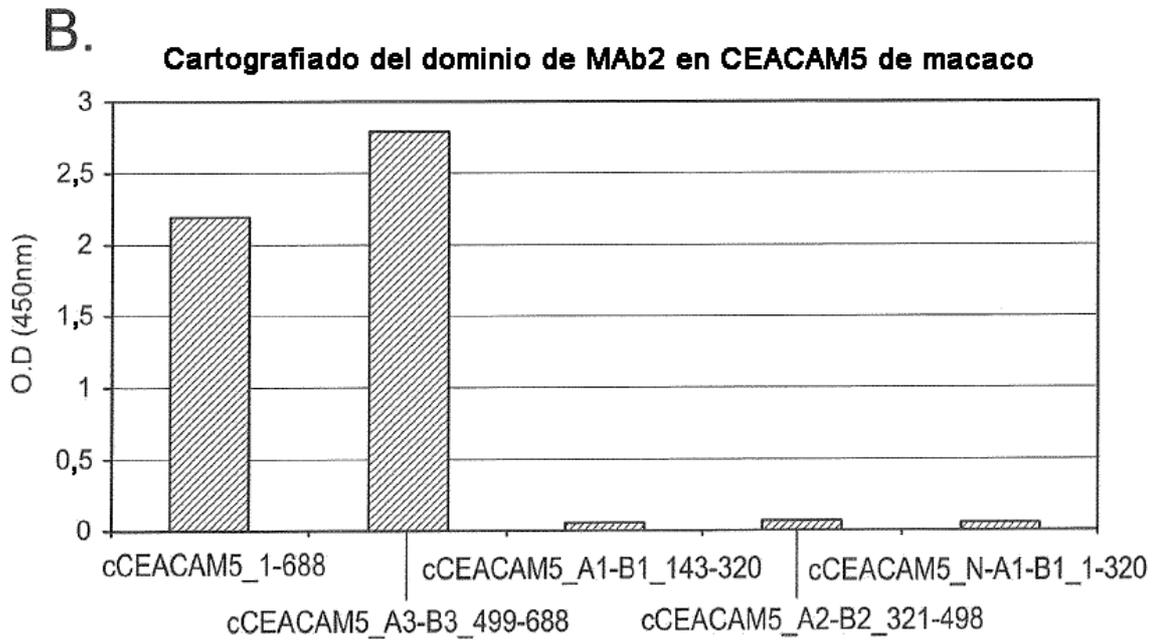
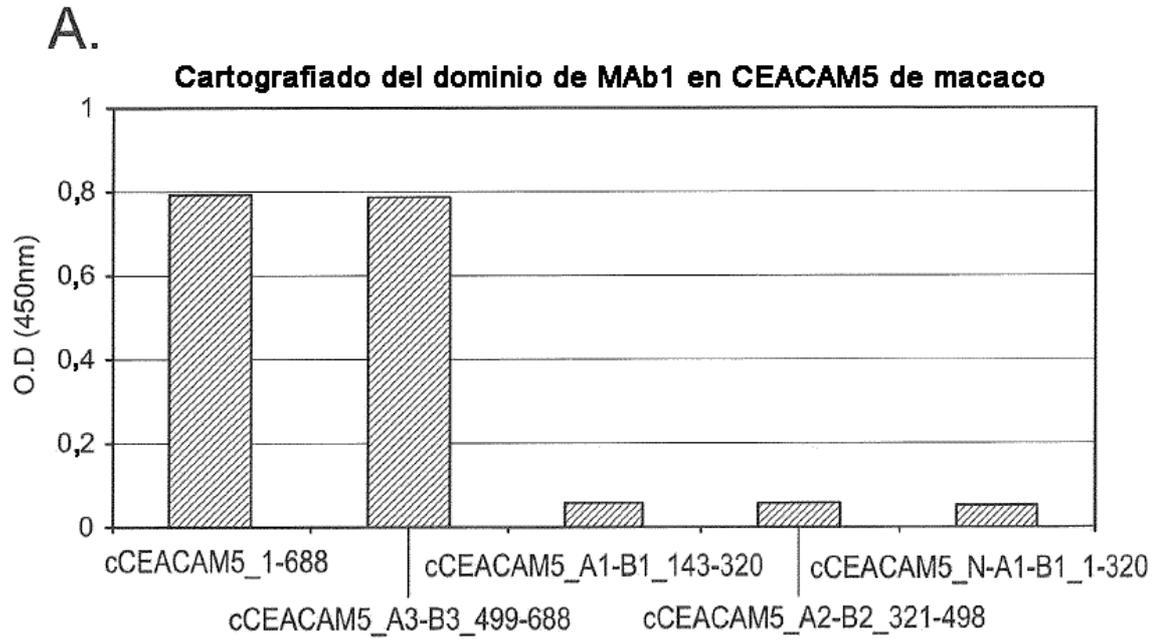
**FIG.2** Comienzo



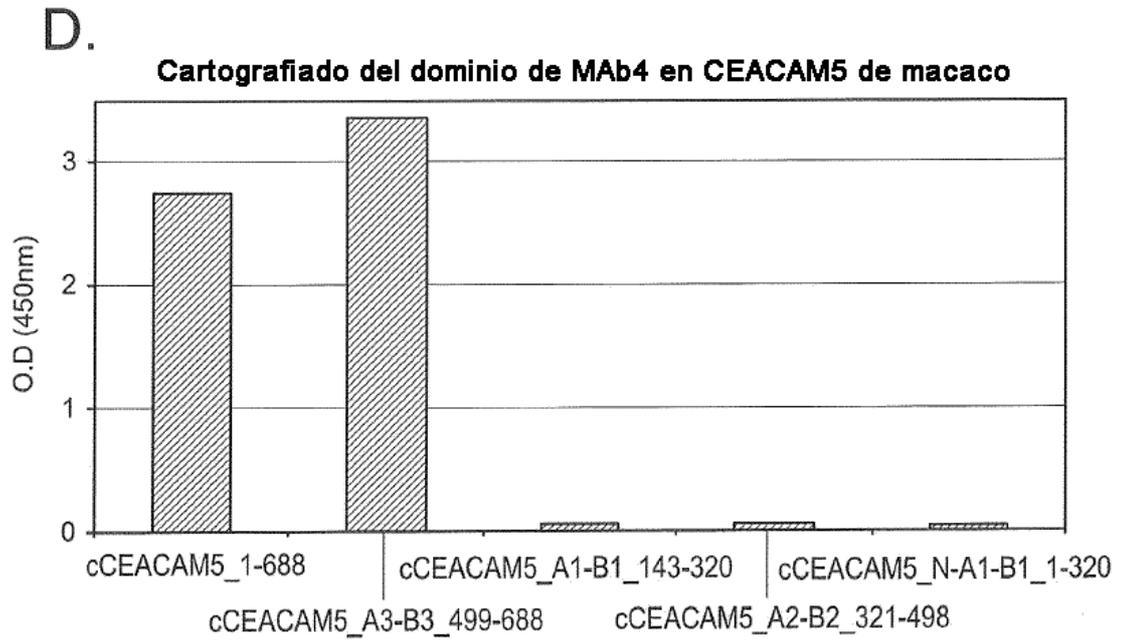
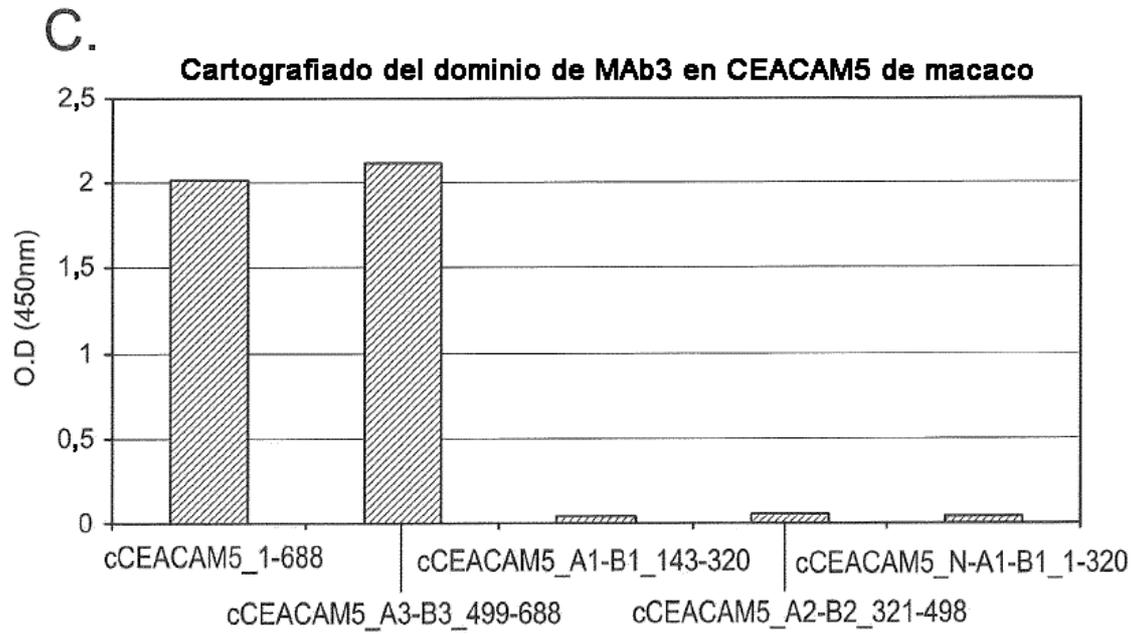
**FIG.2** Continuación



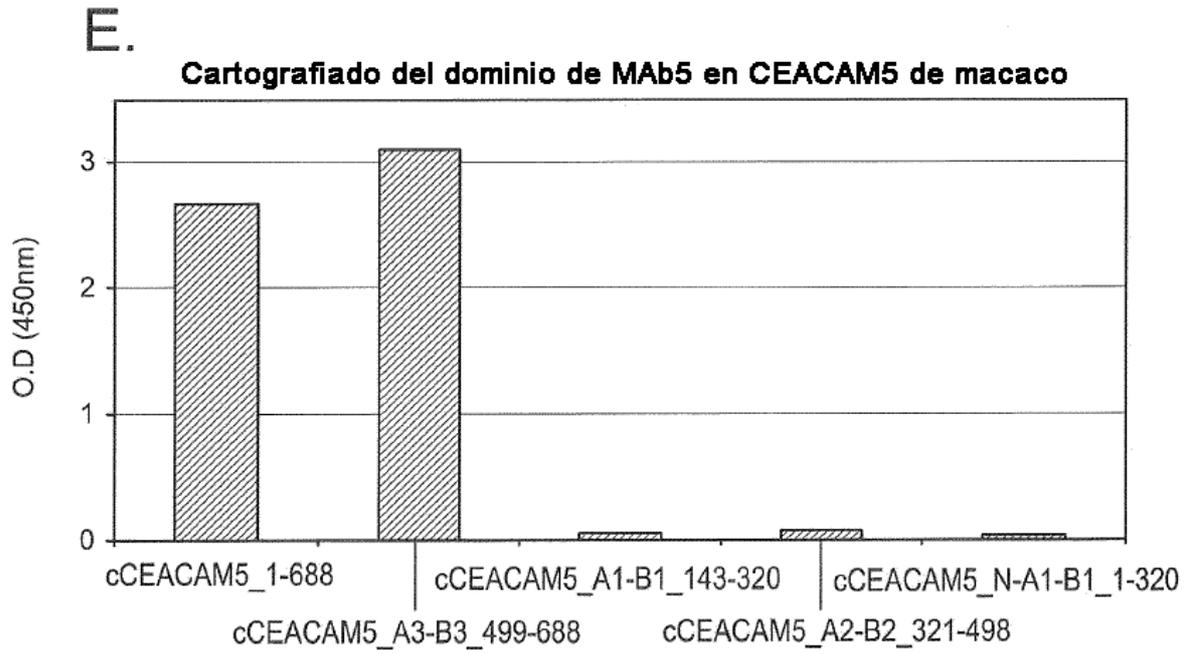
**FIG.2 Final**



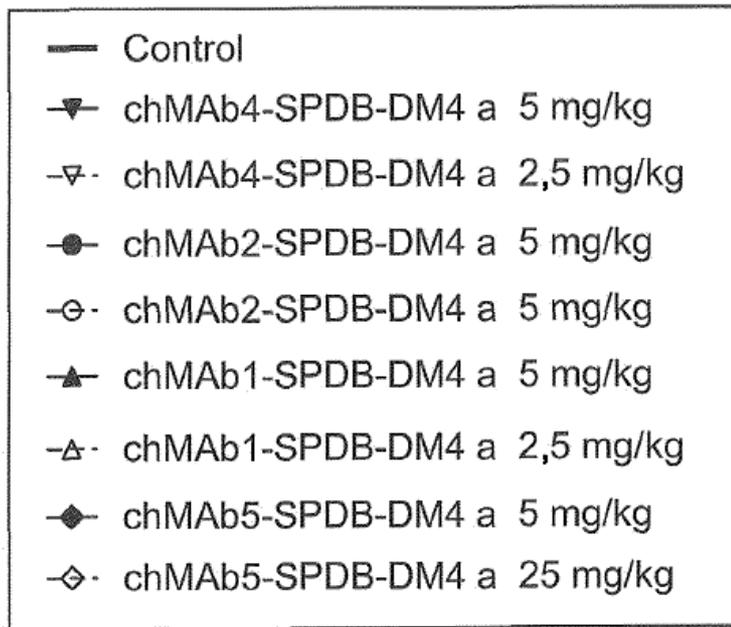
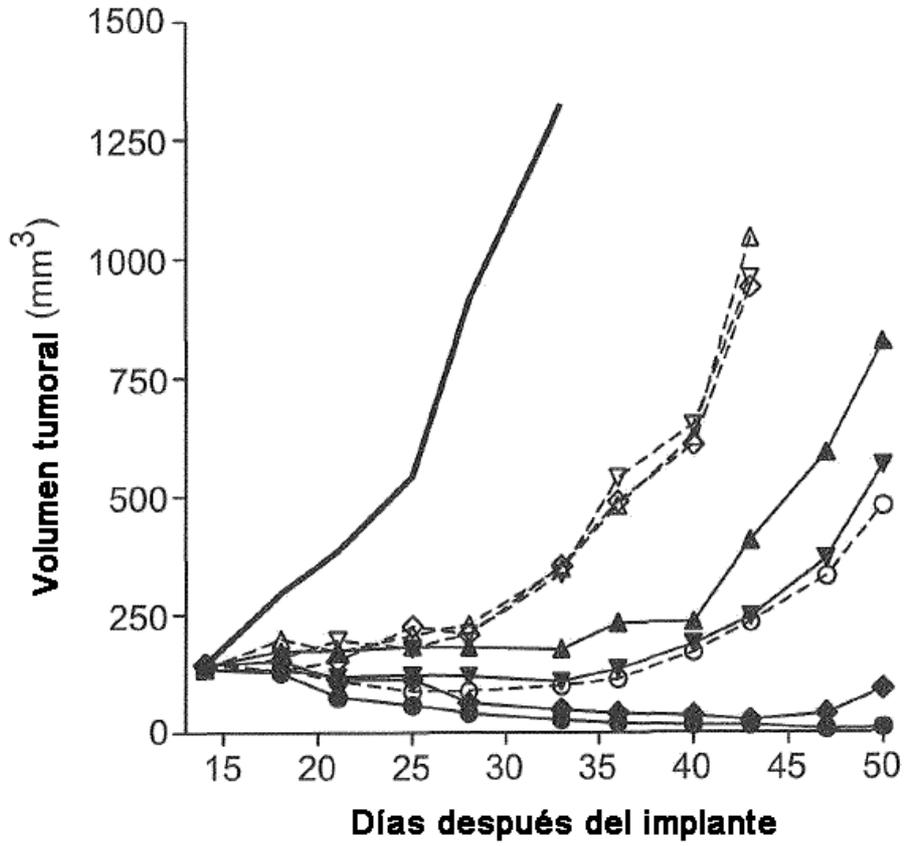
**FIG.3** Comienzo



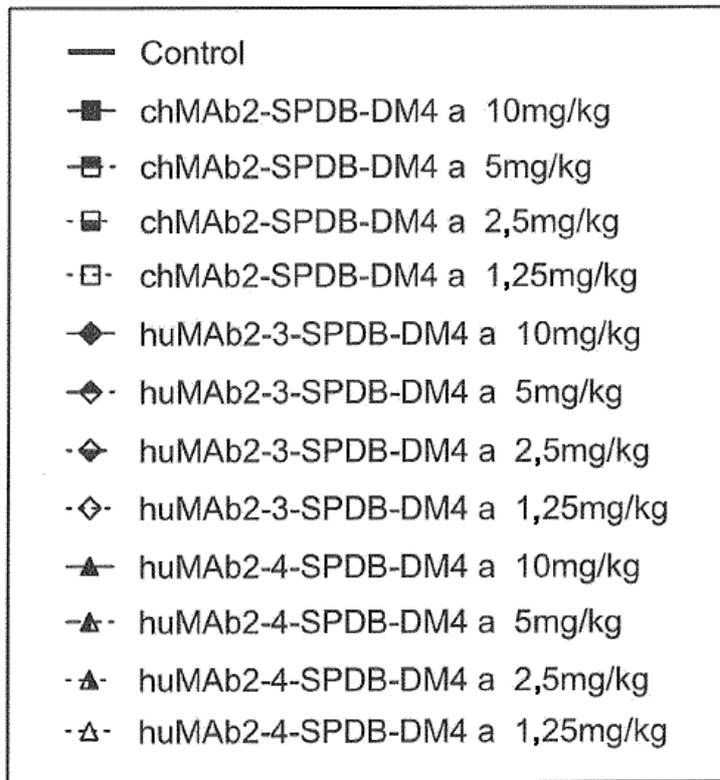
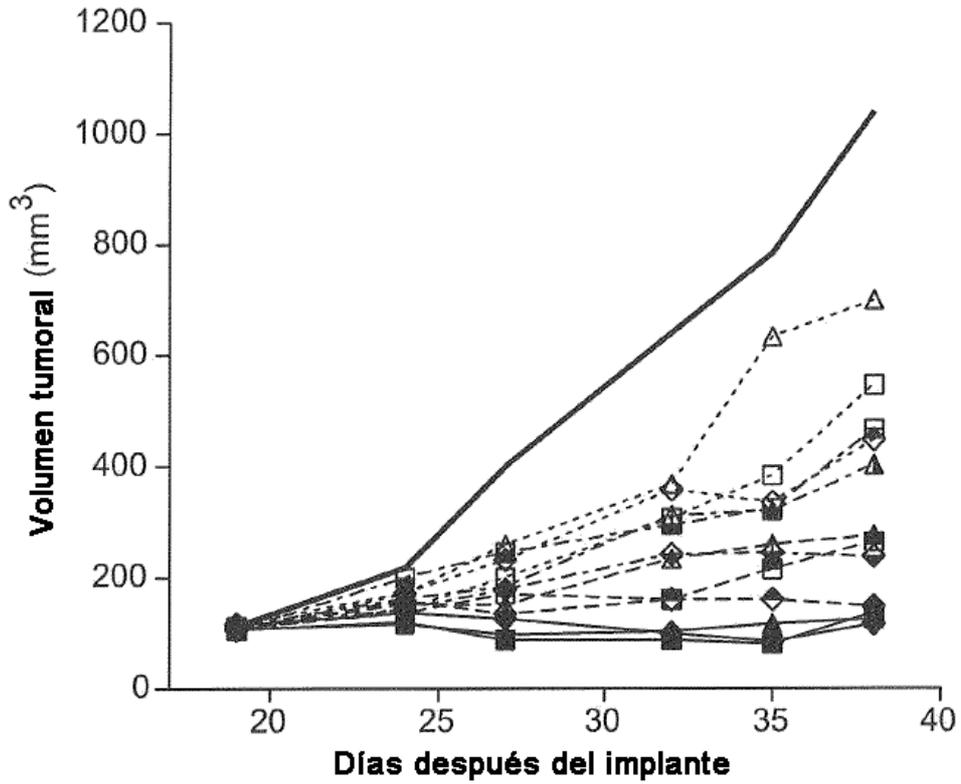
**FIG.3** Continuación



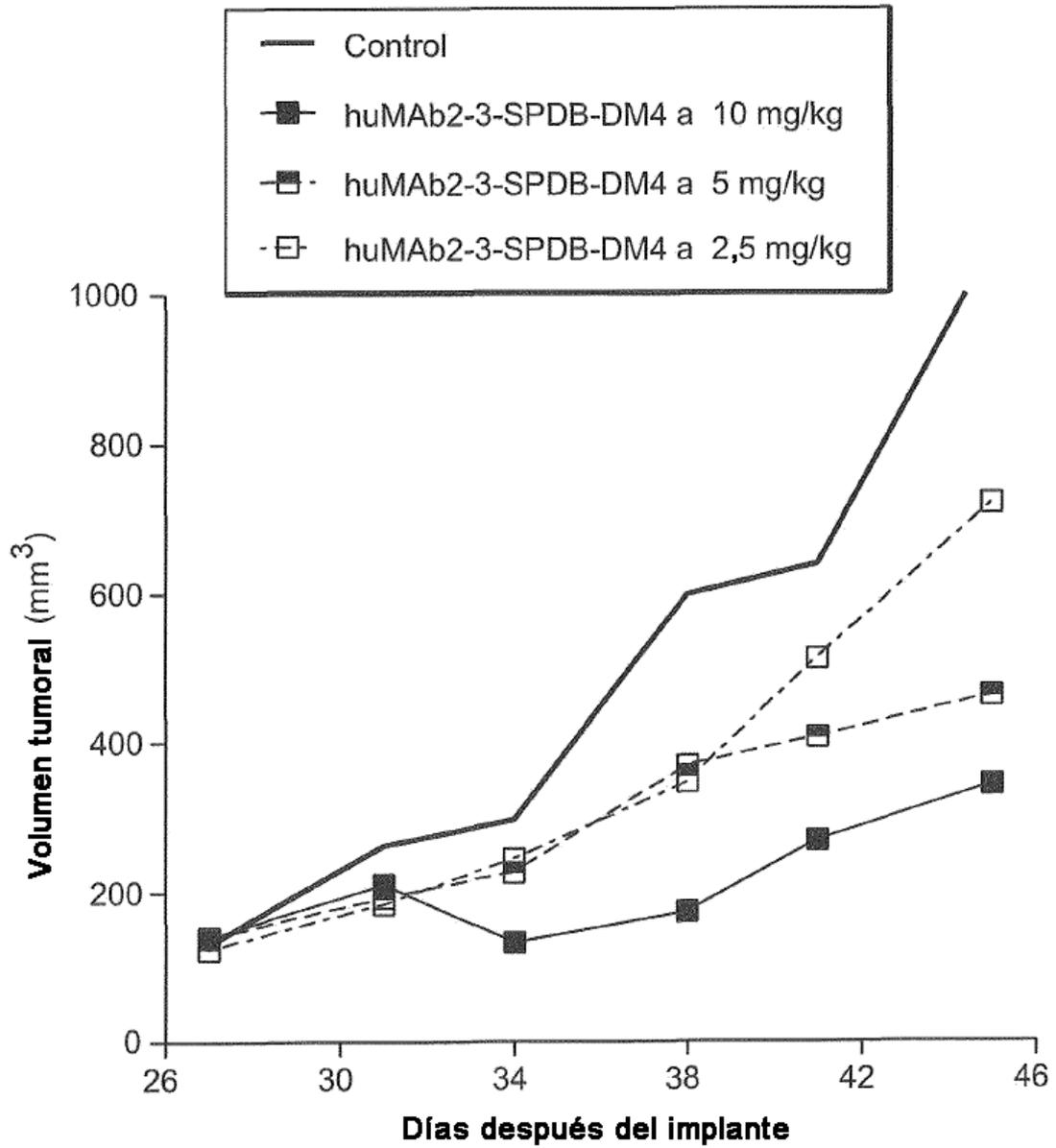
**FIG.3** Final



**FIG.4**



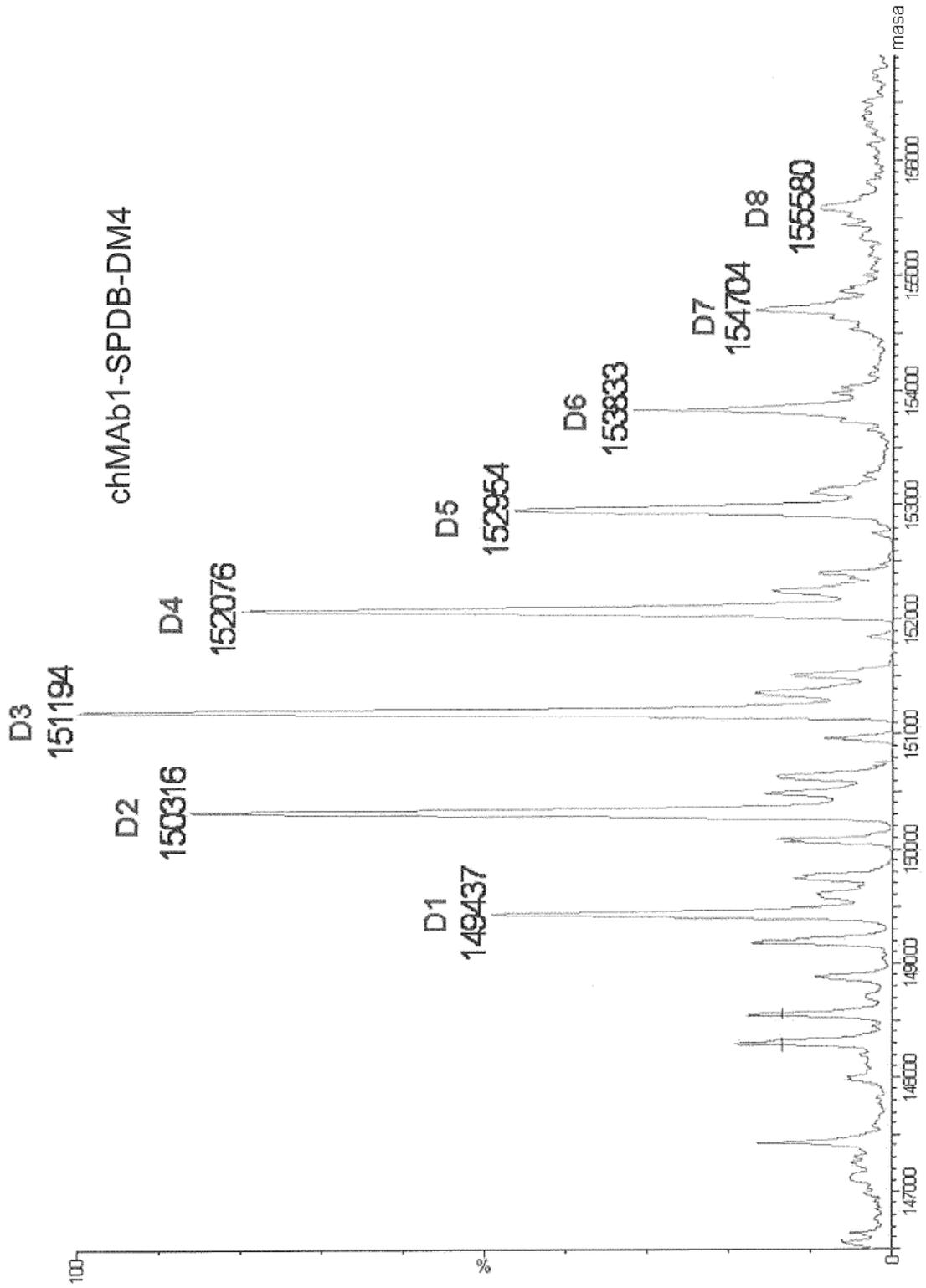
**FIG.5**



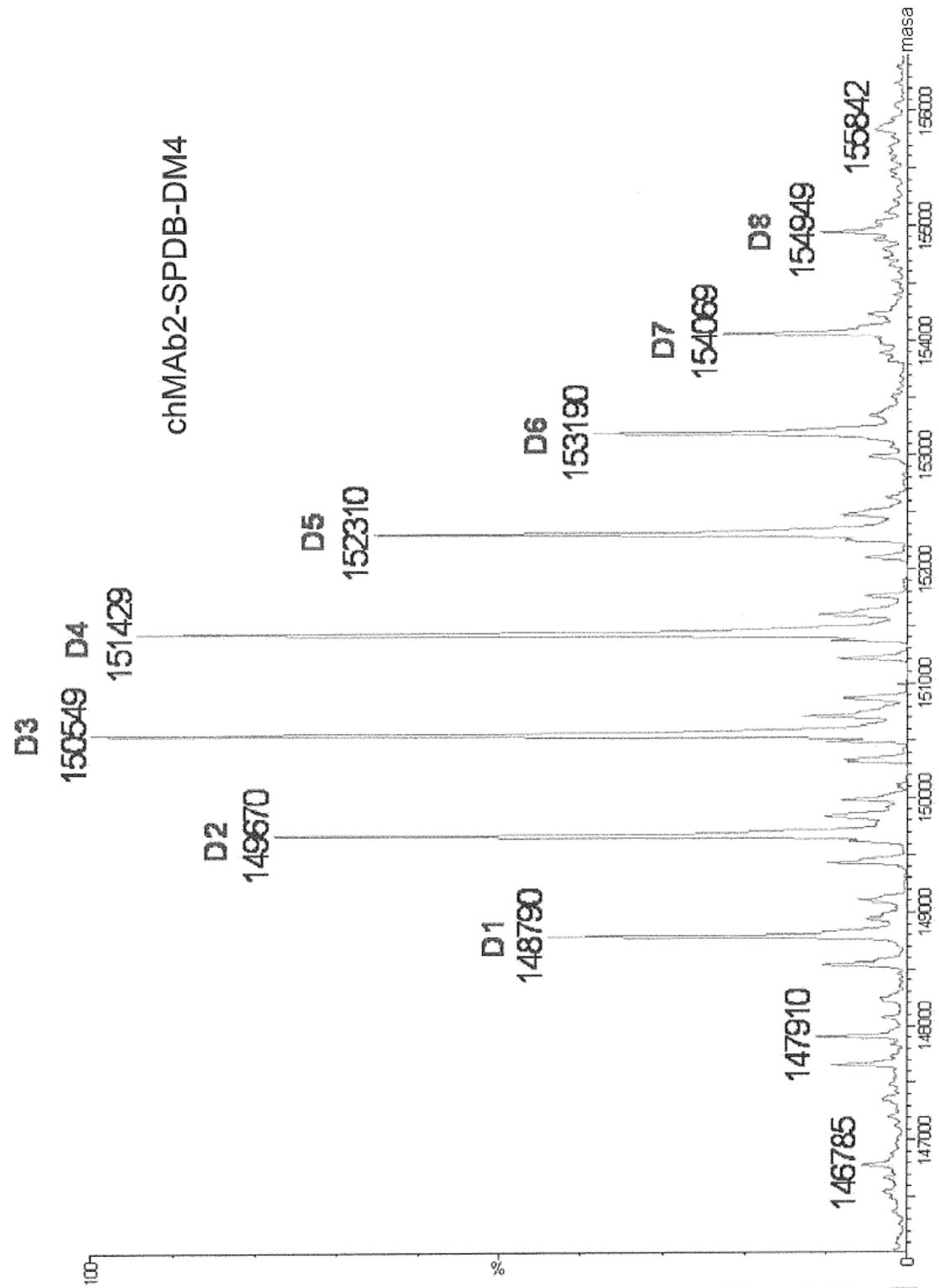
**FIG.6**

MAb3	VH	(1)	EVKLVESGGGLVKPGGSLTLP	CAAS	<b>GF</b>	<b>TF</b>	<b>SR</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>-D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>															
MAb1	VH	(1)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLS	CAAS	<b>GF</b>	<b>TF</b>	<b>SY</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>																
MAb4	VH	(1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLS	CAAS	<b>GF</b>	<b>TF</b>	<b>SS</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>																
MAb5	VH	(1)	ELQLVESGGGLVKPGGSLKLS	CAAS	<b>GF</b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>															
MAb2	VH	(1)	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLS	CAAS	<b>GF</b>	<b>V</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>															
MAb3	VH	(60)	PDSVKGRFTVSRDNARNILFL	QMSS	LR	SE	D	T	G	M	Y	C	A	R	V	N	Y	D	S	S	F	L	D	W	M	G	Q	T	T	L	T	V	S																
MAb1	VH	(61)	LDSVKGRFTISRDNAKNTLY	LQMSS	LR	SE	D	T	A	M	Y	C	A	R	P	A	Y	G	N	P	A	M	Y	W	G	Q	T	S	V	T	V	S																	
MAb4	VH	(61)	ADTVKGRFTISRDNAKNTLY	LQMSS	LR	SE	D	T	A	M	F	Y	C	A	A	H	Y	F	G	T	S	G	P	F	A	Y	W	G	T	L	V	T	V	S															
MAb5	VH	(61)	PDTVKGRFTISRDNARNTLY	LQMSS	LR	SE	D	T	A	I	Y	Y	C	T	A	H	Y	F	G	S	S	G	P	F	A	Y	W	G	T	L	V	T	V	S															
MAb2	VH	(61)	PDTVQGRFTVSRDNAKNTLY	LQMNS	LR	SE	D	T	A	I	Y	Y	C	A	A	H	Y	F	G	S	S	G	P	F	A	Y	W	G	T	L	V	T	V	S															
MAb3	VH	(1)	DIVMTQSQRFMS	T	L	E	G	D	R	V	S	V	T	C	K	A	S	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>P</b>
MAb1	VH	(1)	DILMTQSQKFMS	T	S	V	G	D	R	V	S	V	T	C	K	A	S	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>P</b>
MAb4	VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETV	T	I	T	C	R	A	S	<b>E</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>A</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>O</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>P</b>									
MAb5	VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETV	T	I	T	C	R	A	S	<b>E</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>O</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>P</b>									
MAb2	VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETV	T	I	T	C	R	A	S	<b>E</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>O</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>P</b>									
MAb3	VH	(61)	RFTGSGSGTDFTLT	I	S	N	V	Q	S	E	D	L	A	E	Y	F	C	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>Y</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>I</b>	<b>K</b>														
MAb1	VH	(61)	RFTGSGSGTDFTLT	I	S	N	V	Q	S	E	D	L	A	E	Y	F	C	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>I</b>	<b>K</b>														
MAb4	VH	(61)	RFSGSGGTQFSLKINS	L	O	P	E	D	F	G	T	Y	Y	C	<b>Q</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>-F</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>K</b>																
MAb5	VH	(61)	RFSGSGGTQFSLKINS	L	O	P	E	D	F	G	S	Y	C	<b>Q</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>-F</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>I</b>	<b>K</b>																	
MAb2	VH	(61)	RFSGSGGTQFSLKINS	L	O	P	E	D	F	G	S	Y	C	<b>Q</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>-F</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>I</b>	<b>K</b>																	

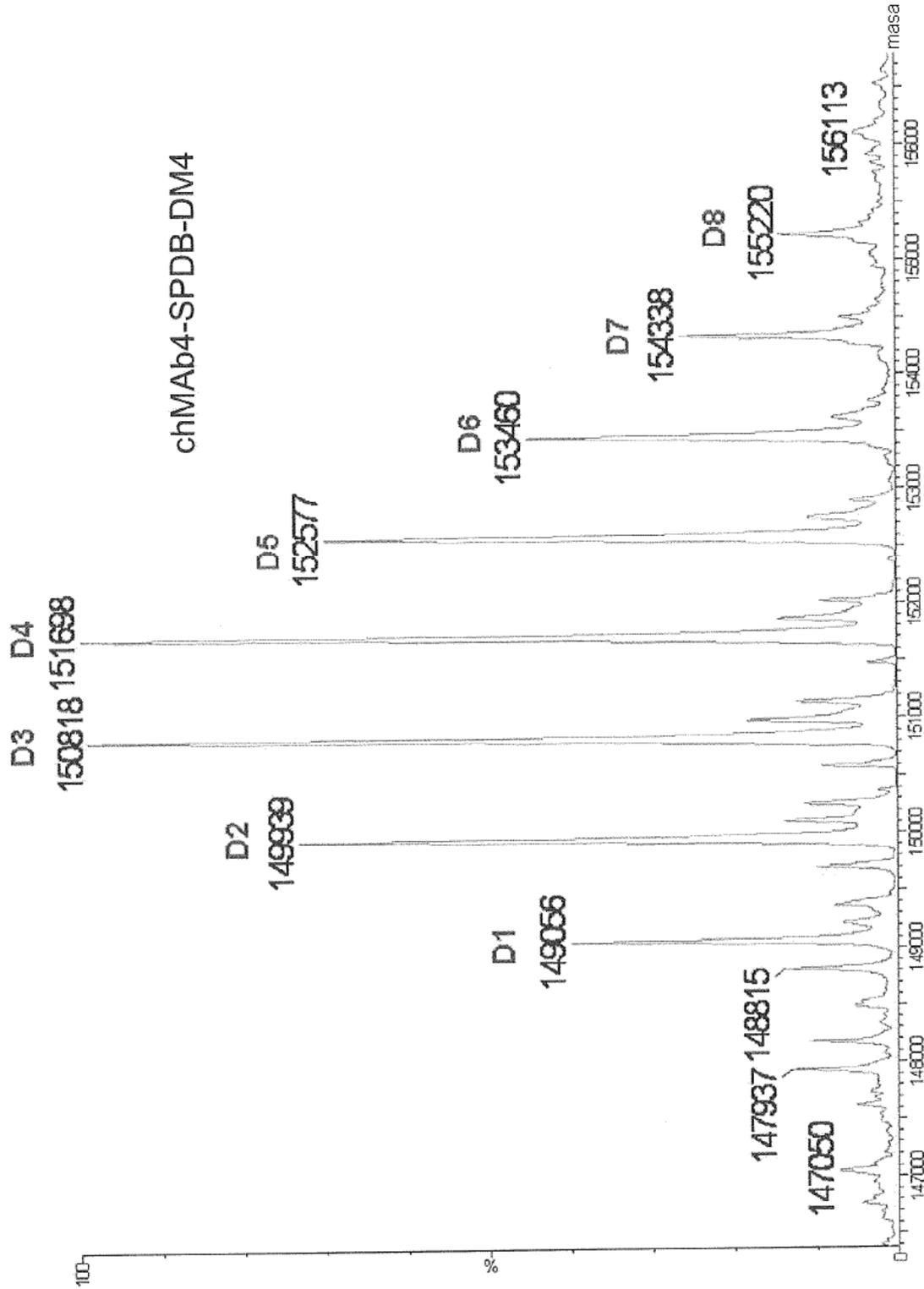
**FIG.7**



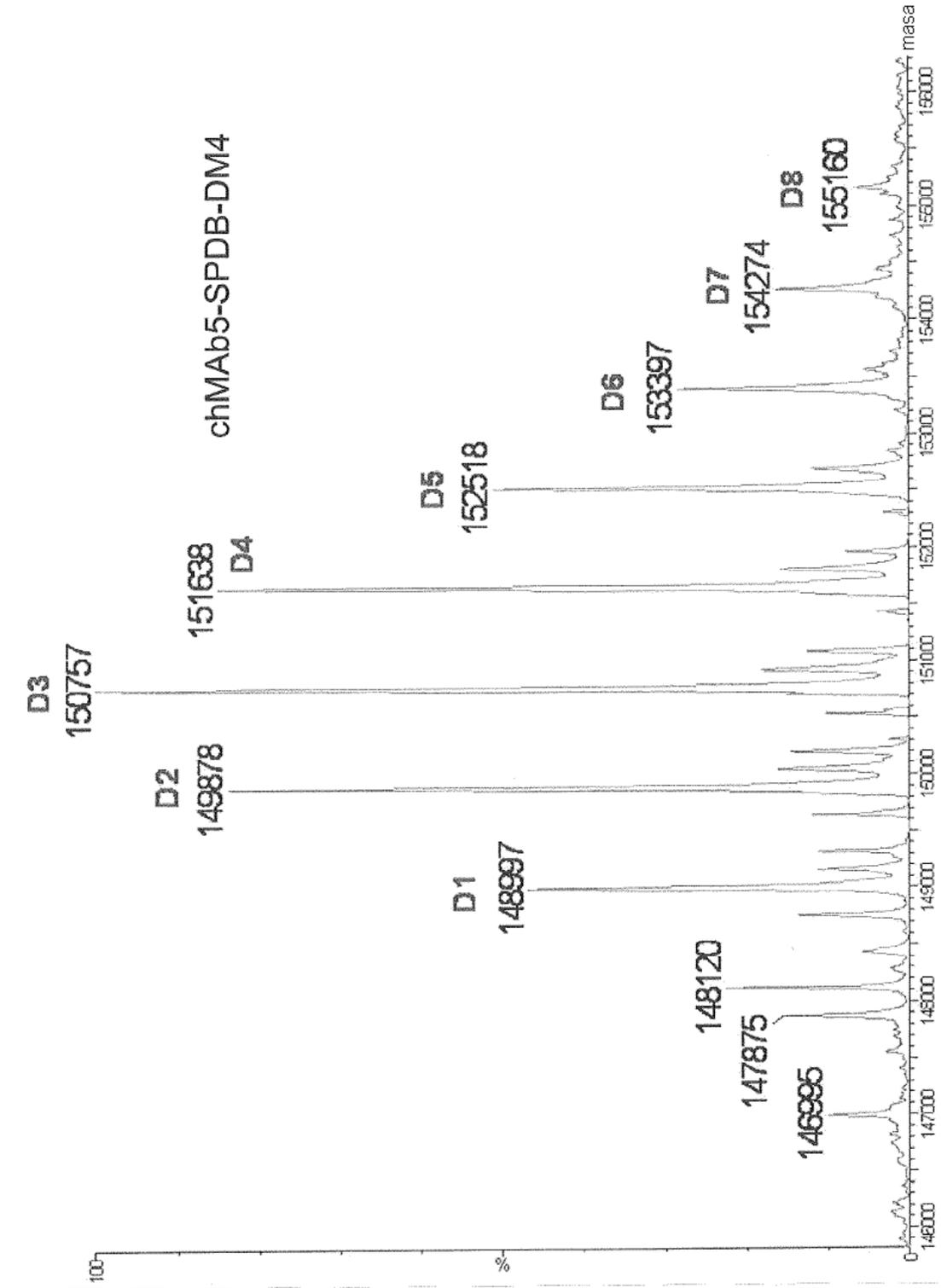
**FIG. 8**



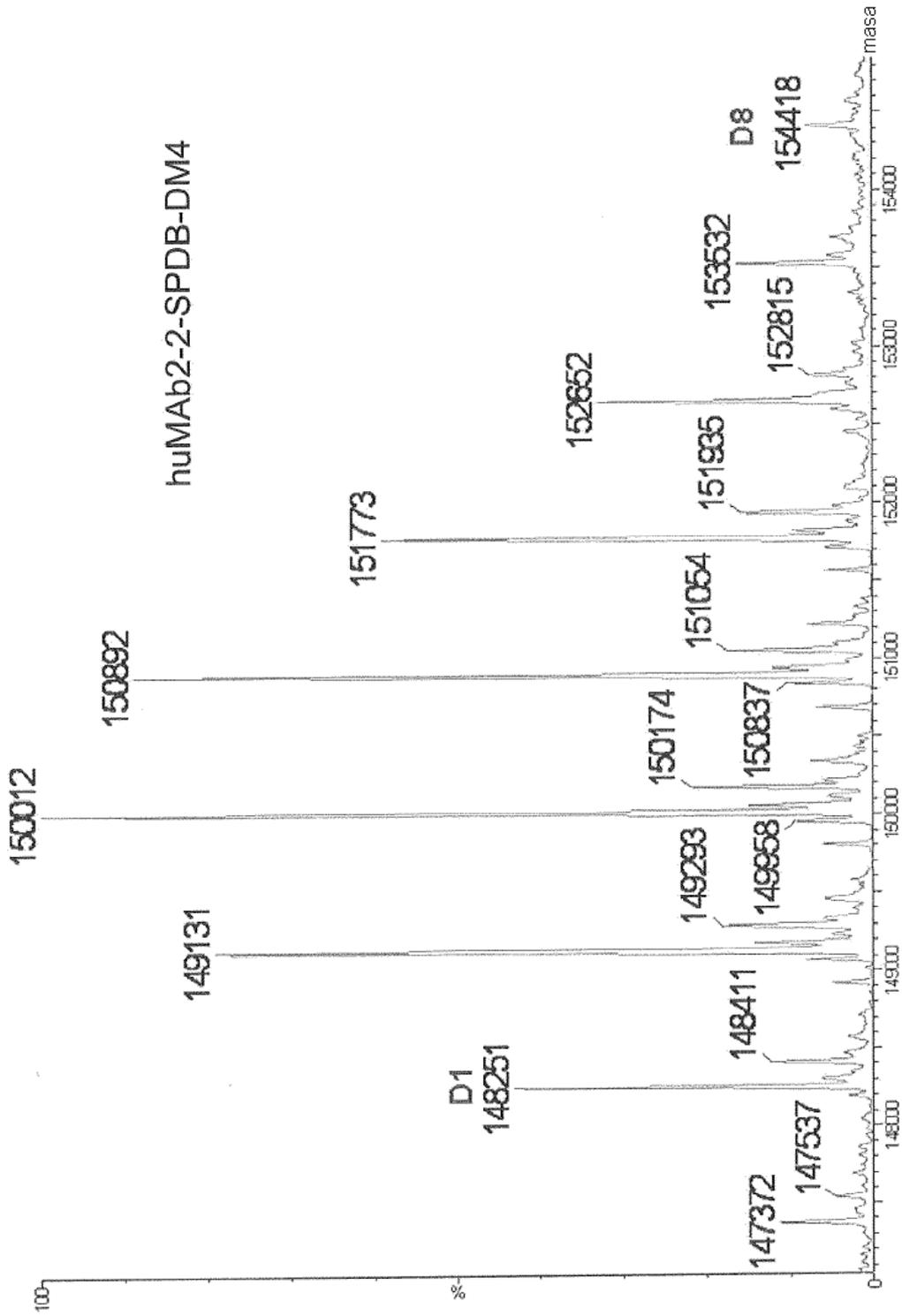
**FIG. 9**



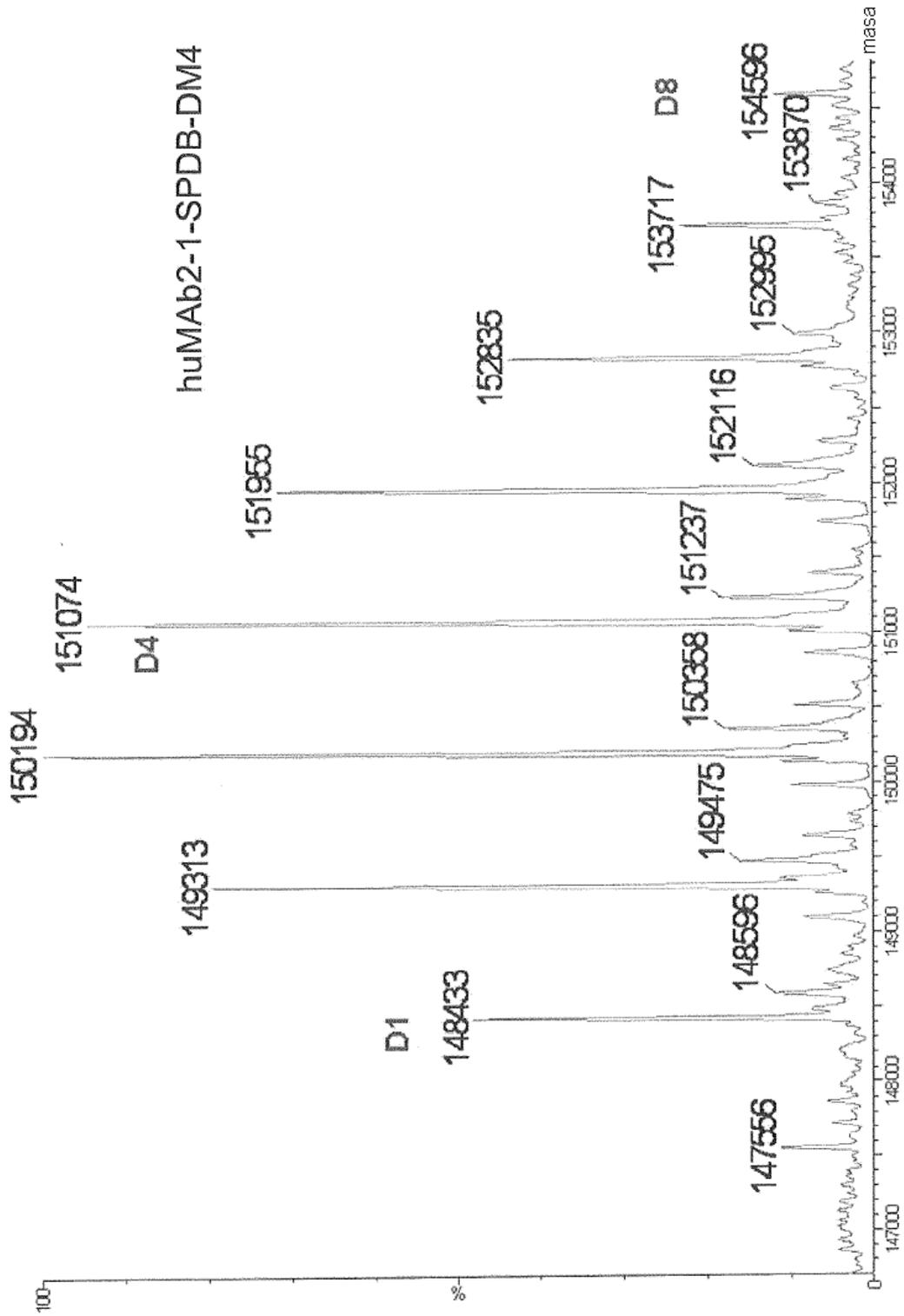
**FIG.10**



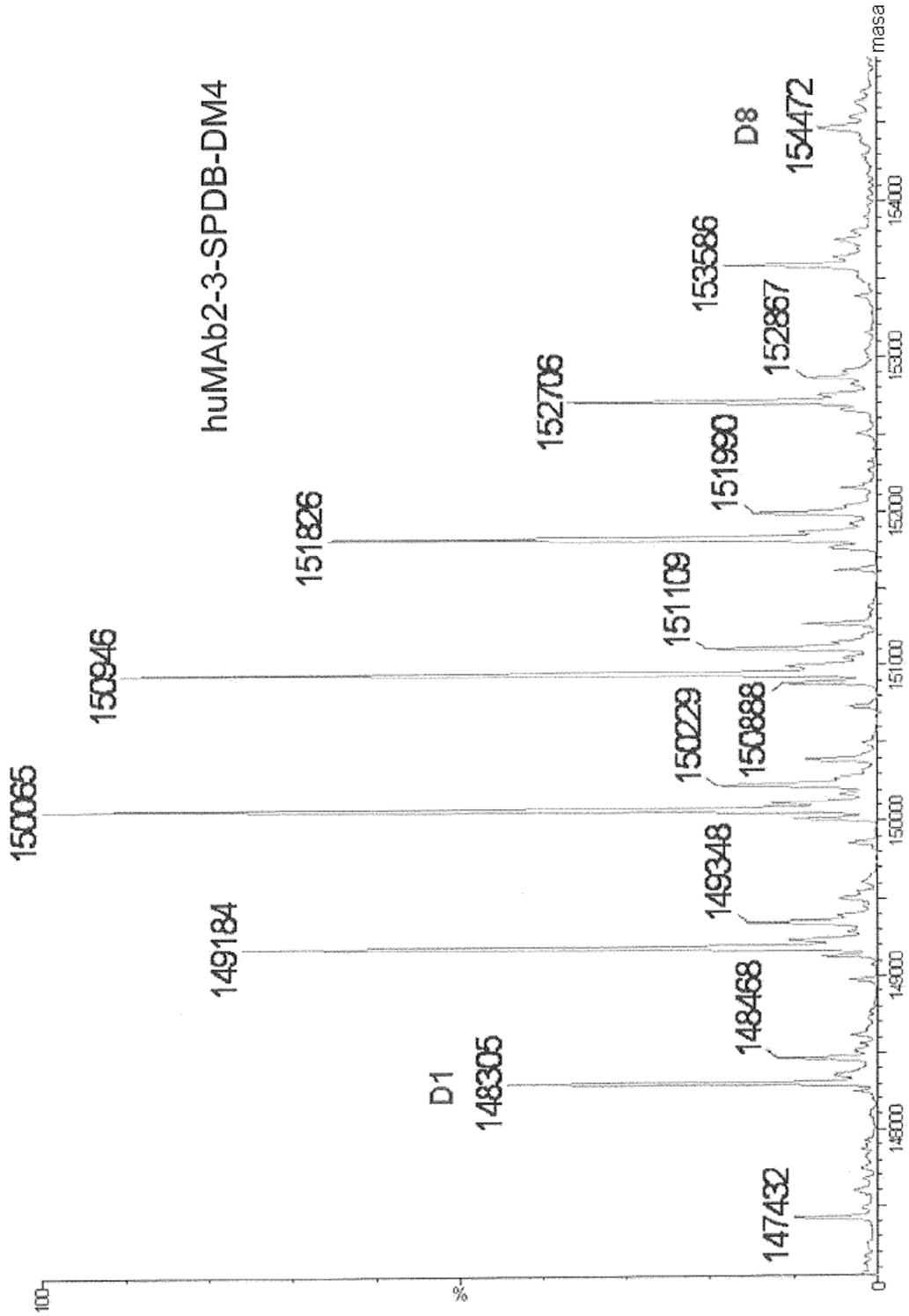
**FIG.11**



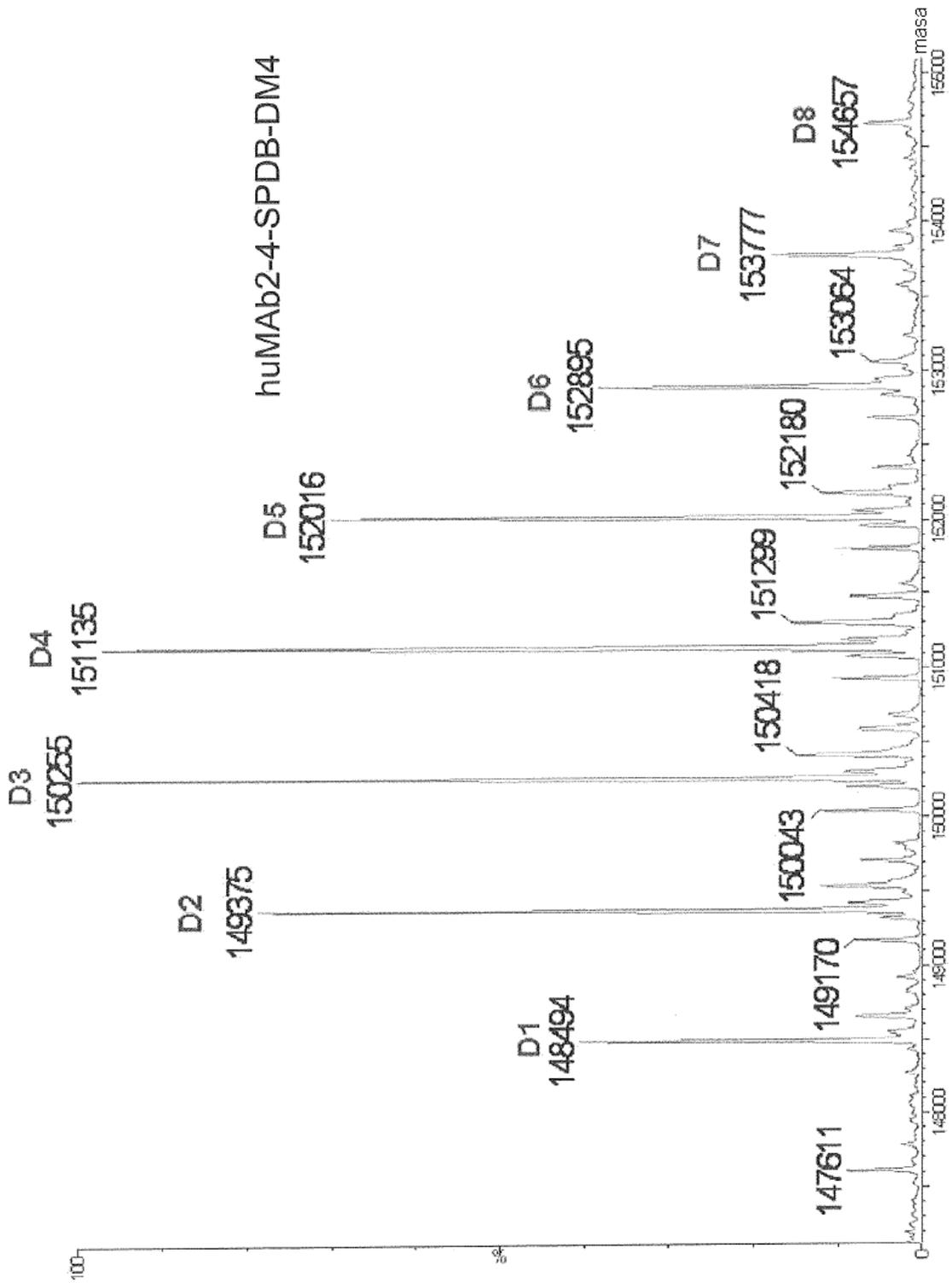
**FIG.12**



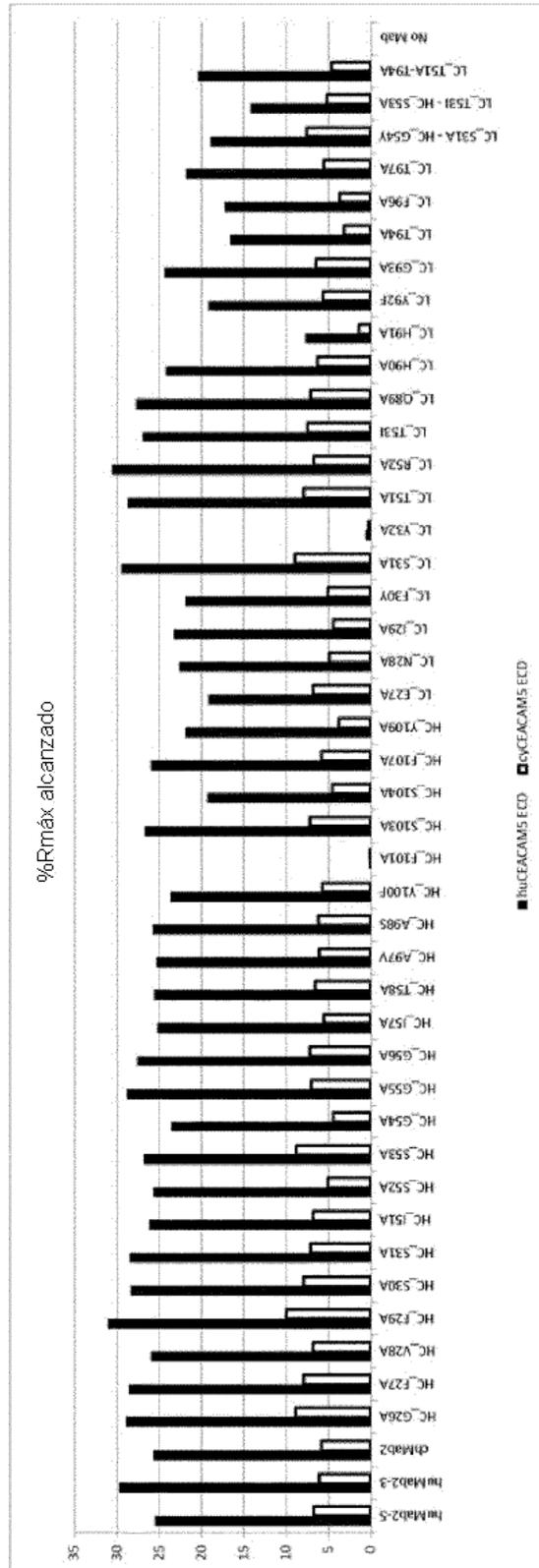
**FIG.13**



**FIG.14**



**FIG.15**



**FIG.16**

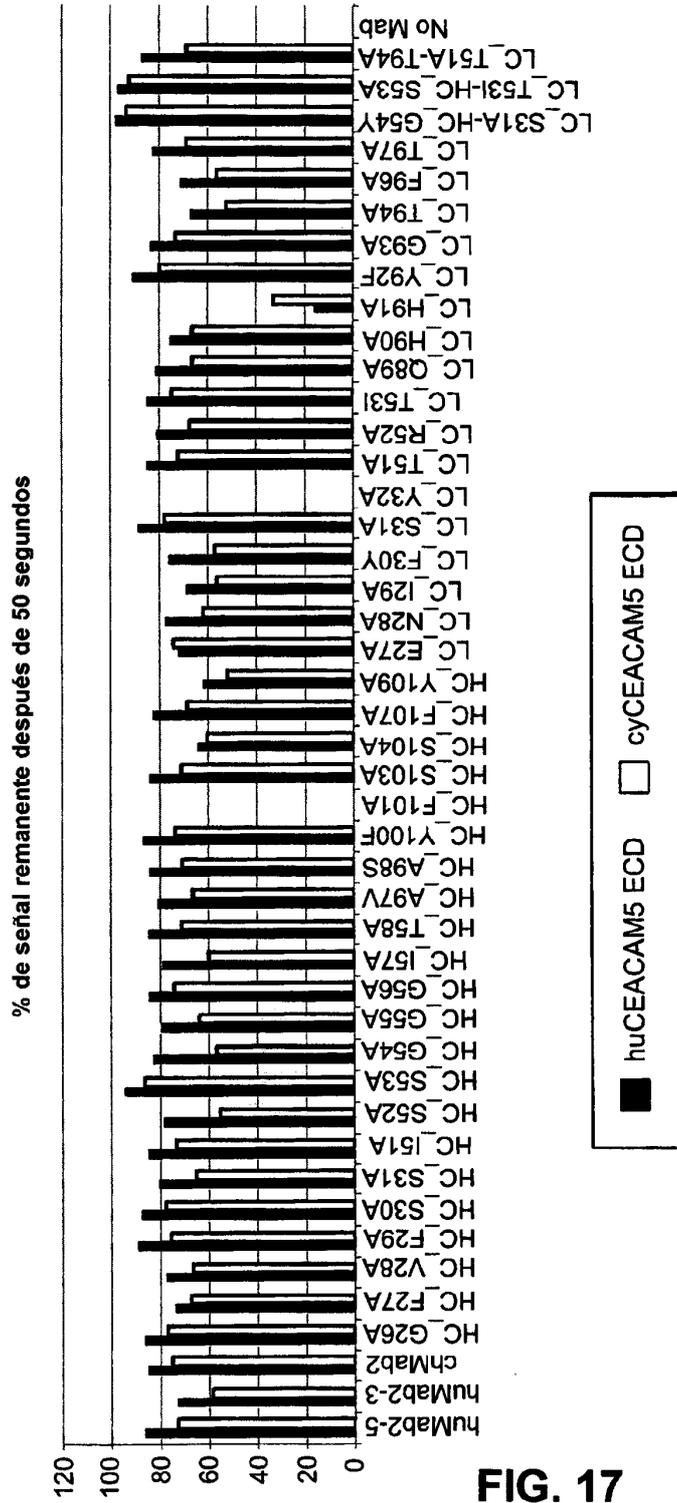
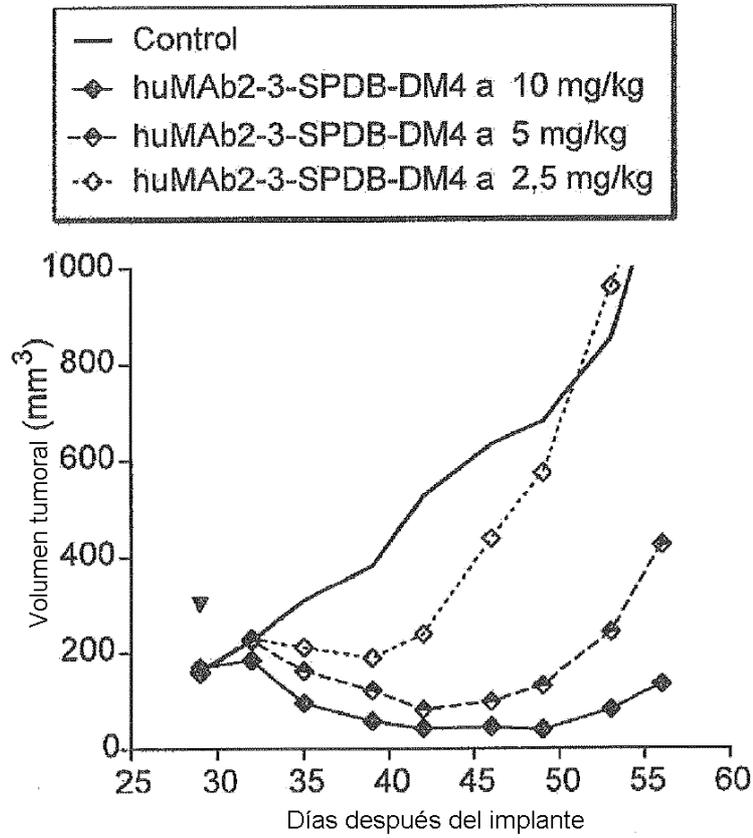
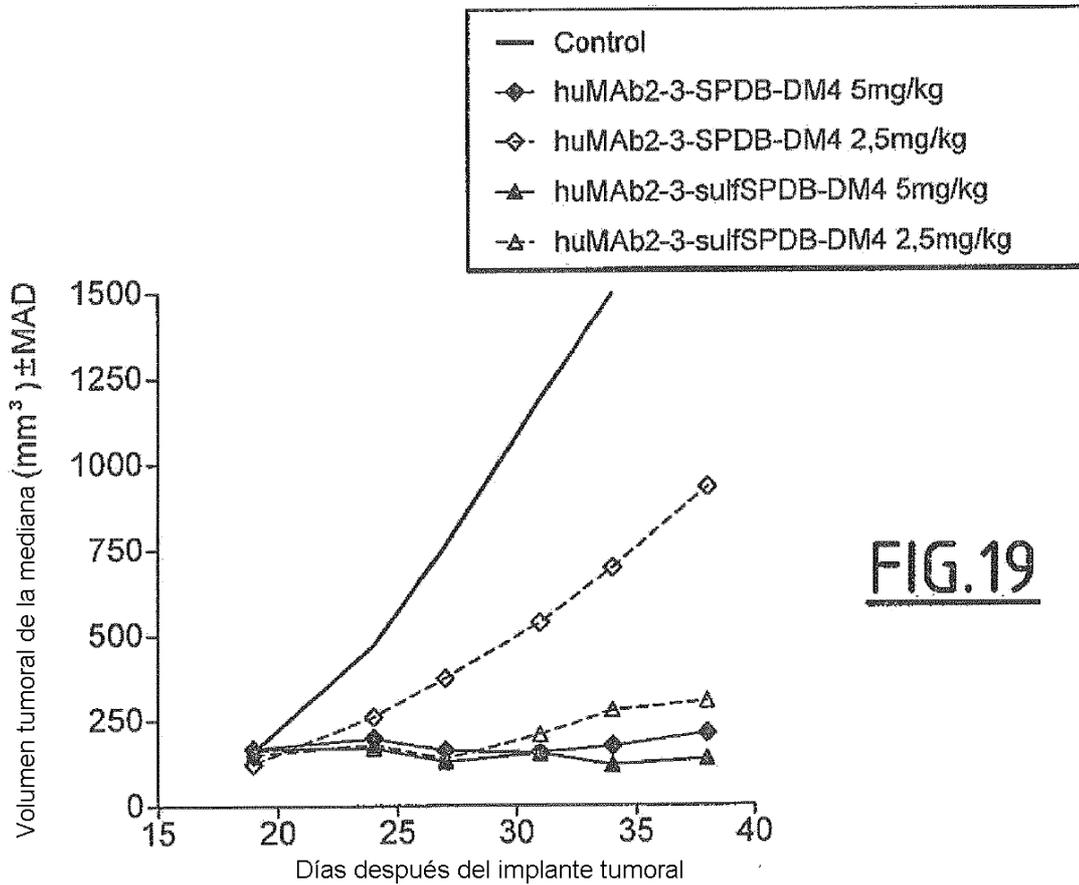


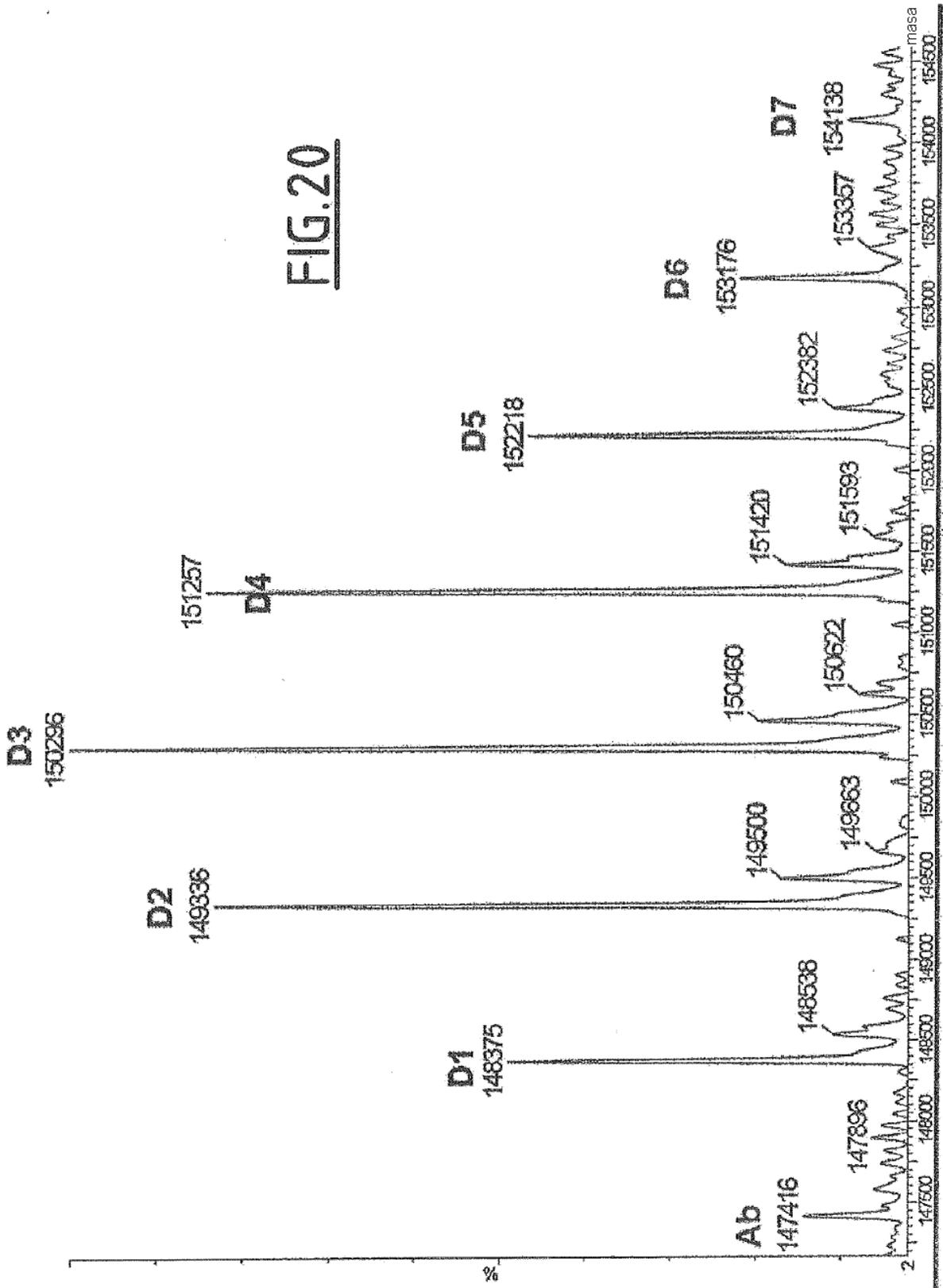
FIG. 17

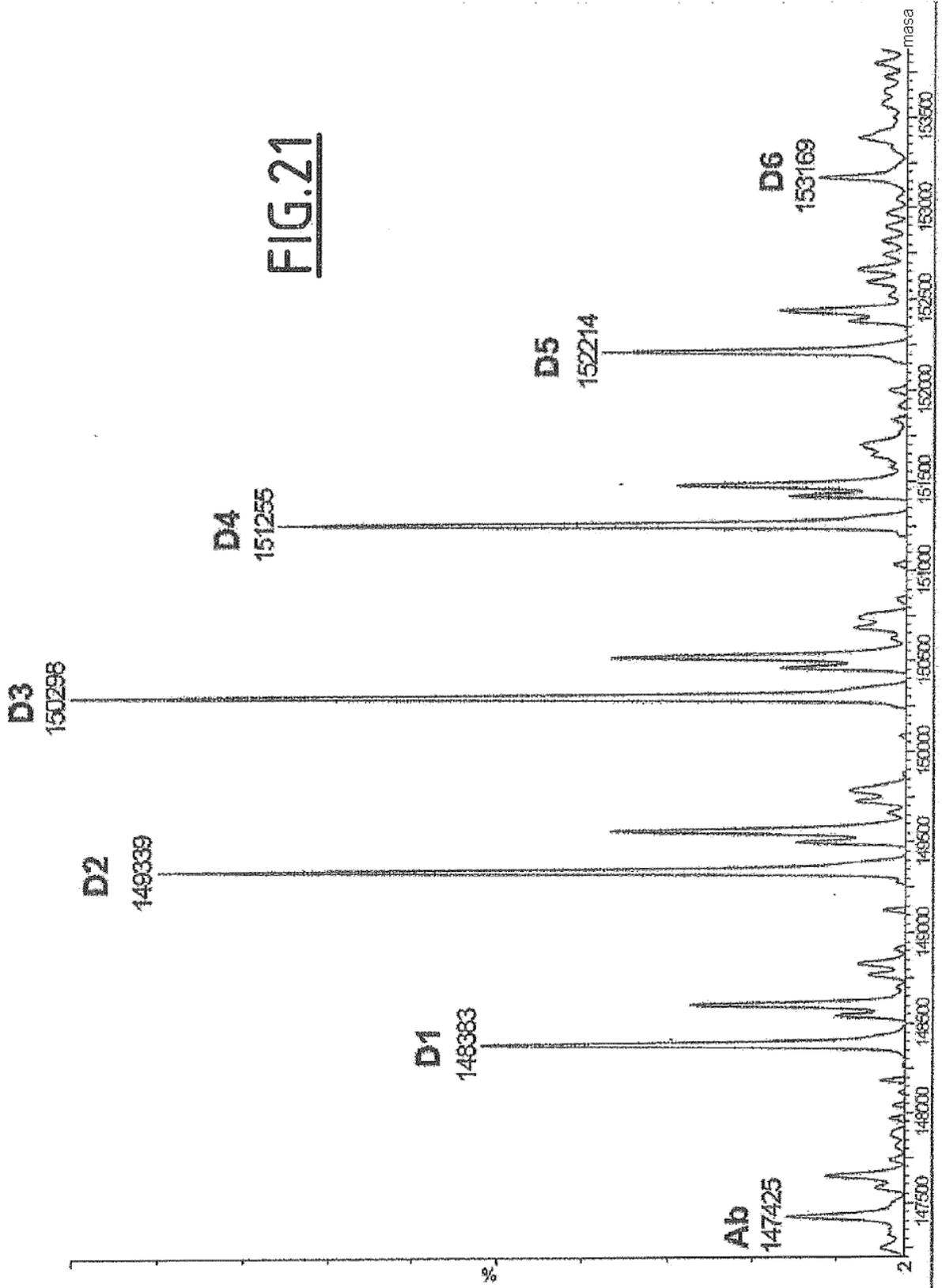


**FIG.18**



**FIG.19**





Alineamiento de dominio variable de cadena pesada

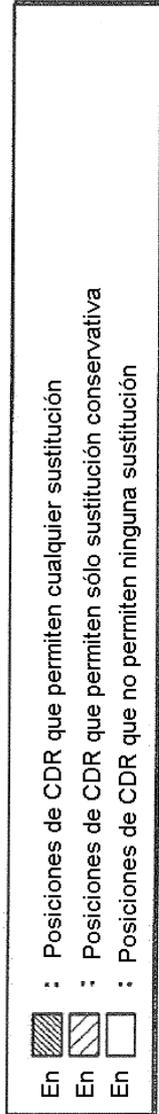
Mab2	SEQ ID NO: 33	(1)	EVQLQESGGVLVQPGGSLKLSKAAS	<b>GFVFSYD</b>	MSWVRQTPEKRLEWVAY	<b>ISSGGGIT</b>	YF	(60)
Mab4	SEQ ID NO: 37	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS	<b>GFTFSYD</b>	MSWVRQTPEKRLEWVAF	<b>ISSYGGRT</b>	YY	(60)
Mab5	SEQ ID NO: 39	(1)	ELQLVESGGVLVQPGGSLKLSKAAS	<b>GFAFSYD</b>	MSWVRQTPEKRLEWVTY	<b>INSGGGIT</b>	YY	(60)
VH1a humanizado	SEQ ID NO: 5	(1)	EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAAS	<b>GFVFSYD</b>	MSWVRQTPERGLEWVAY	<b>ISSGGGIT</b>	YA	(60)
VH1 humanizado	SEQ ID NO: 51	(1)	EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAAS	<b>GFVFSYD</b>	MSWVRQTPERRLEWVAY	<b>ISSGGGIT</b>	YF	(60)
VHg2 humanizado	SEQ ID NO: 74	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSKAAS	<b>GFVFSYD</b>	MSWVRQAPGKLEWVSY	<b>ISSGGGIT</b>	YY	(60)
Mab2	SEQ ID NO: 33	(61)	PDTVQGRFTVSRDNAKNTLYLQMN	SLKSEDTAIYYC	<b>AAHYFGSSGPF</b>	FAYWGQGT	LVTVSA	(120)
Mab4	SEQ ID NO: 37	(61)	ADTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS	SLKSEDTAMFYC	<b>AAHYFGTSGPF</b>	FAYWGQGT	LVTVSA	(120)
Mab5	SEQ ID NO: 39	(61)	PDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMS	SLKSEDTAIYYC	<b>TAHYFGSSGPF</b>	FAYWGQGT	LVTVSA	(120)
VH1a humanizado	SEQ ID NO: 5	(61)	PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMN	SLTSEDTAVYYC	<b>AAHYFGSSGPF</b>	FAYWGQGT	LVTVSS	(120)
VH1 humanizado	SEQ ID NO: 51	(61)	PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMN	SLTSEDTAIYYC	<b>AAHYFGSSGPF</b>	FAYWGQGT	LVTVSA	(120)
VHg2 humanizado	SEQ ID NO: 74	(61)	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYC	<b>AAHYFGSSGPF</b>	FAYWGQGT	LVTVSS	(120)

	En	: Posiciones de CDR que permiten cualquier sustitución
	En	: Posiciones de CDR que permiten sólo sustitución conservativa
	En	: Posiciones de CDR que no permiten ninguna sustitución

**FIG.22**

Alineamiento de dominio variable de cadena ligera

Mab2	SEQ ID NO:34	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIFSYLAWYQQKQKSPQLLVY NTKTLAEGVPS (60)
Mab4	SEQ ID NO:38	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIYSYFAYWYQQKQKSPQLLVY NAKILAEGVPS (60)
Mab5	SEQ ID NO:40	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVY NAKTITTEGVPS (60)
VL1 humanizado	SEQ ID NO:17	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPKSPKLLVY NTKTLAEGVPS (60)
VL1a humanizado	SEQ ID NO:23	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVRTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPKSPKLLVY NTRTLAEGVPS (60)
VL1c humanizado	SEQ ID NO:29	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPKSPKLLVY NTRTLAEGVPS (60)
VL1d humanizado	SEQ ID NO:55	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPKSPKLLVY NTRTLAEGVPS (60)
VLg5 humanizado	SEQ ID NO:75	(1) DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRAS <del>ENIFSYLAWYQQKPKSPKLLVY NTRTLAEGVPS</del> (60)
Mab2	SEQ ID NO:34	(61) RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC QHHYGTPTT FGSGTKLEIK (107)
Mab4	SEQ ID NO:38	(61) RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYYC QHHYGIPPT FGSGTKLEIK (107)
Mab5	SEQ ID NO:40	(61) RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC QHHYGTPTT FGSGTKLEIK (107)
VL1 humanizado	SEQ ID NO:17	(61) RFSGSGSGTQFSLTISSLQPEDFGSYYC QHHYGTPTT FGSGTKLEIK (107)
VL1a humanizado	SEQ ID NO:23	(61) RFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYC QHHYGTPTT FGSGTKLEIK (107)
VL1c humanizado	SEQ ID NO:29	(61) RFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYC QHHYGTPTT FGSGTKLEIK (107)
VL1d humanizado	SEQ ID NO:55	(61) RFSGSGSGTQFSLTISSLQPEDFGSYYC QHHYGTPTT FGSGTKLEIK (107)
VLg5 humanizado	SEQ ID NO:75	(61) RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <del>QHHYGTPTT FGSGTKLEIK</del> (107)



**FIG.23**