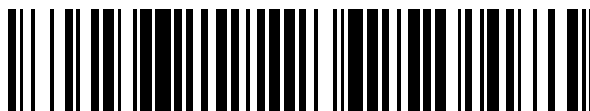


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 614**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2012** **PCT/US2012/067207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013** **WO13082366**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2012** **E 12854214 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** **EP 2785743**

54 Título: **Anticuerpos recombinantes anti-CEACAM1 para terapia contra el cáncer**

30 Prioridad:

01.12.2011 US 201161565640 P

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

13.04.2020

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**BLUMBERG, RICHARD S.;
HUANG, YU-HWA y
UTKU, NALAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 753 614 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 recombinantes anti-CEACAM1 para terapia contra el cáncer

5 APOYO GUBERNAMENTAL

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno con la subvención n.º R01 DK51362, otorgada por el National Institutes of Health. El Gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes y partes de unión a antígeno de los mismos contra CEACAM1, y su uso como agentes terapéuticos en la citólisis y el rechazo de células tumorales, así como agentes de diagnóstico y agentes de direccionamiento para la obtención de imágenes moleculares y a la administración dirigida de otros agentes terapéuticos.

Antecedentes

Según los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud, diez millones de personas en todo el mundo fueron diagnosticadas con el cáncer en 2000, y seis millones murieron a causa de él. Además, las estadísticas indican que la tasa de incidencia de cáncer está en aumento en todo el mundo. En América, por ejemplo, las proyecciones sugieren que el cuarenta por ciento de los vivos hoy serán diagnosticados con algún tipo de cáncer en algún momento de sus vidas. Para el año 2010, ese número habrá subido al cincuenta por ciento. De todos los cánceres, el cáncer de páncreas es el undécimo cáncer más común y la cuarta causa principal de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres.

La tecnología moderna, tal como la que implica el uso de hibridomas, ha puesto a disposición de investigadores y médicos fuentes de anticuerpos monoclonales altamente específicos y potentes útiles en procedimientos generales de diagnóstico y clínicos. Por ejemplo, actualmente hay anticuerpos terapéuticos para el tratamiento del cáncer, como HERCEPTIN® (trastuzumab, Genentech) para el cáncer de mama metastásico y PANOREX® (endorecolomab, Centocor/GlaxoSmithKline) aprobado en Alemania para el tratamiento del cáncer colorrectal. El documento WO2010125571 describe un hibridoma que produce anticuerpos contra la proteína transmembrana CEACAM1.

Sumario

La invención debe interpretarse por referencia a las reivindicaciones. También se proporcionan en el presente documento anticuerpos monoclonales recombinantes y porciones de unión a antígeno de los mismos útiles para inhibir CEACAM1 en células tumorales. De manera más específica, en el presente documento se proporcionan nuevas composiciones, que comprenden anticuerpos y péptidos recombinantes de unión anti-CEACAM1, y métodos de su uso en terapias de proliferación e invasividad antitumorales, tales como el tratamiento del cáncer, particularmente el cáncer de páncreas. Además, las composiciones que comprenden los péptidos de unión anti-CECAM descritos en el presente documento son útiles en métodos de evaluación e imagen, tales como diagnósticos complementarios para determinar la expresión de CEACAM1 en biopsias tumorales para identificar posibles respondedores para enfoques de medicina personalizada, obtención de imágenes moleculares dirigida a CEACAM1, que se pueden usar, por ejemplo, en el control en serie de respuesta(s) a la terapia y detección *in vivo* de tumores. Además, tales diagnósticos proporcionan enfoques novedosos para terapias contra el cáncer para su uso en aplicaciones de medicina personalizada. Además, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a anti-CEACAM 1 descritas en el presente documento son útiles como restos de direccionamiento para otras composiciones de diagnóstico y terapéuticas, en combinación con agentes de entrega como nanopartículas, polyplexos, micropartículas, etc. Dichos péptidos de unión a anti-CEACAM1 también pueden denominarse antagonistas de CEACAM1.

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan en algunos aspectos anticuerpos monoclonales recombinantes aislados específicos de CEACAM1 o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen al antígeno reconocido por los anticuerpos monoclonales 5F4, 34B1 o 26H7 que comprenden: al menos un componente de cadena ligera y al menos un componente de cadena pesada. En algunas realizaciones de estos aspectos, el al menos un componente de la cadena pesada comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, o la SEQ ID NO: 30 y el al menos un componente de la cadena ligera comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 o la SEQ ID NO:32.

En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo monoclonal recombinante anti-CEACAM1 específico es un anticuerpo humanizado o una porción del mismo.

En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo monoclonal recombinante anti-CEACAM1 específico es un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo recombinante específico de CEACAM1 aislado unido a las regiones constantes de inmunoglobulina gamma-1 y kappa humanas, respectivamente.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan anticuerpos recombinantes aislados o porciones de unión a antígeno de los mismos que comprenden: una región determinante de complementariedad de la cadena pesada (CDR) 1 que consiste en los restos de aminoácidos SSHGMS (SEQ ID NO:1), una CDR2 de la cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos TISSGGTYTYPDSVKG (SEQ ID NO:2), una CDR3 de la cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos HFDYDAWFAY (SEQ ID NO:3), una CDR1 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos SANSSVSYMY (SEQ ID NO: 4), una CDR2 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos LTSNLAS (SEQ ID NO:5) y una CDR3 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos QQWSSNPPT (SEQ ID NO:6), de modo que el anticuerpo recombinante aislado o la porción de unión a antígeno del mismo se une al antígeno reconocido por 5F4.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan anticuerpos recombinantes aislados o porciones de unión a antígeno de los mismos que comprenden: una región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR) 1 que consiste en los restos de aminoácidos SSHGMS (SEQ ID NO:1), SFYGM (SEQ ID NO:7), o SDYYLY (SEQ ID NO:13); una CDR2 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos TISSGGTYTYPDSVKG (SEQ ID NO:2), TFSGGNYTYPDSVKG (SEQ ID NO:8) o TISVGGGNTSYPDSVKG (SEQ ID NO:14); una CDR3 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos HFDYDAWFAY (SEQ ID NO:3), o HGGLPFYAMDY (SEQ ID NO:9), o GLTTGPAWFAY (SEQ ID NO:15); una CDR1 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos SANSSVSYMY (SEQ ID NO: 4), SVSSSISSNLH (SEQ ID NO:10), KSSQSLNSSNQKNYLA (SEQ ID NO:16), o RASQISGYLS (SEQ ID NO:19); una CDR2 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos LTSNLAS (SEQ ID NO:5), SVSSSISSNLH (SEQ ID NO:10), FASTRES (SEQ ID NO:17), o AASTLDS (SEQ ID NO:20); y una CDR3 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos QQWSSNPPT (SEQ ID NO:6), QQWSSHPFT (SEQ ID NO:12), QQHYSTPWT (SEQ ID NO:18) o LQYASSLMYT (SEQ ID NO:21); tal que los anticuerpos recombinantes aislados o las porciones de unión a antígeno de los mismos se unen al antígeno reconocido por los anticuerpos denominados en el presente documento como 5F4, 34B1 o 26H7.

En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, la porción de anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fd', un fragmento Fv, un fragmento de dAb, un fragmento de F(ab')₂, un fragmento de cadena sencilla, un diacuerpo o un anticuerpo lineal.

En el presente documento se proporcionan, en algunos aspectos, kits de diagnóstico que comprenden cualquiera de los anticuerpos monoclonales recombinantes específicos de CEACAM1 aislados o porciones de unión a antígeno de los mismos, anticuerpos humanizados y/o anticuerpos quiméricos descritos en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan, en algunos aspectos, composiciones que comprenden cualquiera de los anticuerpos monoclonales recombinantes específicos de CEACAM1 aislados o porciones de unión a antígeno de los mismos, anticuerpos humanizados y/o anticuerpos quiméricos descritos en el presente documento y un vehículo.

En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, los anticuerpos monoclonales recombinantes aislados específicos de CEACAM1 o las porciones de unión a antígeno de los mismos, los anticuerpos humanizados y/o los anticuerpos quiméricos están unidos a un marcador.

En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, los anticuerpos monoclonales recombinantes aislados específicos de CEACAM1 o las porciones de unión a antígeno de los mismos, los anticuerpos humanizados y/o los anticuerpos quiméricos comprenden además un agente conjugado con el anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o una porción del mismo, anticuerpo humanizado y/o anticuerpo quimérico para formar un inmunocombinado específico para CEACAM1. En algunas de dichas realizaciones, el agente conjugado con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo es un agente quimioterapéutico, una toxina, un isótopo radiactivo, una molécula pequeña, un ARNip, una nanopartícula o una microburbuja.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o una porción del mismo, anticuerpo humanizado y/o anticuerpo quimérico que se une específicamente a CEACAM1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar el cáncer de páncreas, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, anticuerpo humanizado y/o anticuerpo quimérico que se une específicamente a CEACAM1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para inhibir la invasividad de las células tumorales en un sujeto que tiene un cáncer o un tumor, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, anticuerpo humanizado y/o anticuerpo quimérico que se une específicamente a CEACAM1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, los métodos comprenden además administrar uno o más agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, agentes citotóxicos y/o agentes antiproliferativos.

- 5 En el presente documento se proporcionan, en algunos aspectos, métodos de inhibición del crecimiento tumoral y de reducción del tamaño tumoral o de la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesite mediante la inhibición de la expresión y/o la función de CEACAM1 en una célula, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, anticuerpo humanizado y/o anticuerpo quimérico que se une específicamente a CEACAM1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para inhibir la progresión del cáncer al inhibir la expresión y/o la función de CEACAM1 en una célula tumoral, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, anticuerpo humanizado y/o anticuerpo quimérico que se une específicamente a CEACAM1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 En el presente documento también se proporcionan, en algunos aspectos, métodos para combinar la obtención de imágenes moleculares dirigidas a CEACAM1 y la administración de un agente terapéutico dirigido a CEACAM1, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente terapéutico y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, anticuerpo humanizado, y/o anticuerpo quimérico que se une específicamente a CEACAM1 conjugado con un resto de direccionamiento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y determinar la presencia o ausencia de la composición farmacéutica conjugada con el resto de direccionamiento utilizando la obtención de imágenes moleculares.

- 20 En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, una molécula pequeña, un péptido o un aptámero.

- 25 En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, anticuerpo humanizado y/o anticuerpo quimérico que se une específicamente a CEACAM1 para su uso en la inhibición de la invasividad de células tumorales en un sujeto que tiene cáncer de páncreas o un tumor pancreático.

- 30 En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, el uso comprende además uno o más agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, agentes citotóxicos y/o agentes antiproliferativos. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, una molécula pequeña, un péptido y/o un aptámero.

- 35 En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, anticuerpo humanizado y/o anticuerpo quimérico que se une específicamente a CEACAM1 para su uso en la inhibición del crecimiento tumoral y la reducción del tamaño del tumor o la metástasis tumoral al inhibir la expresión y/o la función de CEACAM1 en una célula en un sujeto que lo necesite.

- 40 En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan oligonucleótidos aislados que comprenden nucleótidos de la secuencia de la SEQ ID NO:33, en donde dicho oligonucleótido codifica las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo 5F4.

- 45 En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan oligonucleótidos aislados que comprenden nucleótidos de la secuencia de la SEQ ID NO:34, en donde dicho oligonucleótido codifica las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo 5F4.

- 50 En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, los oligonucleótidos aislados comprenden parte de un vector de expresión aislado.

- 55 En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, el vector de expresión aislado comprende o es parte de una célula hospedadora aislada o de población de células hospedadoras aisladas.

- 60 *Definiciones:*

- 65 Por conveniencia, ciertos términos empleados en el presente documento, en la memoria descriptiva, en los ejemplos y en las reivindicaciones adjuntas se recogen en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, o esté implícito en el contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados que se proporcionan a continuación. A menos que se indique explícitamente lo contrario, o sea evidente por el contexto, los términos y frases a continuación no excluyen el significado que el término o frase ha adquirido en la materia a la que pertenece. Las definiciones se

proporcionan para ayudar a describir realizaciones particulares, y no pretenden limitar la invención reivindicada, dado que el alcance de las realizaciones se limita solo por las reivindicaciones. A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, parátomos, CDR), siempre que muestren la actividad biológica y la especificidad deseada. En el contexto de los epítomos de unión específica de CEACAM1, los términos anticuerpo y péptidos de unión a CEACAM1 pueden usarse indistintamente para referirse a la porción de los anticuerpos anti-CEACAM1 específicos descritos en el presente documento que se unen selectivamente al epítomo CEACAM1.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "regiones determinantes de complementariedad" (CDR, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los restos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión del antígeno. Cada dominio variable normalmente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de complementariedad puede comprender restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" tal como se define por Kabat (es decir, aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987, 1991)), y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (es decir, aproximadamente los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Chothia y Lesk 196 J. Mol. Biol. 901 (1987)). En algunos casos, una región determinante de complementariedad puede incluir aminoácidos de una región CDR definida de acuerdo con Kabat y un bucle hipervariable.

Tal como se usa en el presente documento, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las porciones de las cadenas ligeras y pesadas de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) y Regiones Marco (FR). VH se refiere al dominio variable de la cadena pesada. VL se refiere al dominio variable de la cadena ligera. De acuerdo con los métodos utilizados en la presente invención, las posiciones de aminoácidos asignadas a CDR y FR se pueden definir de acuerdo con Kabat. La numeración de aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también está de acuerdo con la de Kabat.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al., 256 *Nature* 495 (1975), o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 7.829.678, N.º 7.314.622). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas en Clackson et al., 352 *Nature* 624 (1991) o Marks et al., 222 *J. Mol. Biol.* 581 (1991), por ejemplo. Un anticuerpo monoclonal puede ser de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales de ratón, rata, cabra, oveja, conejo y ser humano.

El término "fragmento de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de proteína que comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y que, por lo tanto, conserva la capacidad de unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos abarcados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene los dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más restos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd que tiene los dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd' que tiene dominios VH y CH1 y uno o más restos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio CH1; (v) un fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (vi) un fragmento dAb (Ward et al., 341 *Nature* 3544 (1989)), que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (ix) moléculas de anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, Fv de cadena sencilla; scFv) (Bird et al., 242 *Science* 423 (1988); y Huston et al., 85 *PNAS* 5879 (1988)); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger et al., 90 *PNAS* 6444 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al., 8 *Protein*

Engin. 1057 (1995); y Pat. de EE.UU. N.º 5.641.870).

Las "regiones marco" (FR) son aquellos restos de dominio variable que no son los restos de CDR. Cada dominio variable generalmente tiene cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si se definen las CDR de acuerdo con Kabat, los restos de FR de cadena ligera se colocan en aproximadamente los restos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) y 98-107 (LCFR4) y los restos de FR de la cadena pesada se colocan alrededor de los restos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) en los restos de la cadena pesada. Si las CDR comprenden los restos de aminoácidos de los bucles hipervariables, los restos FR de la cadena ligera se colocan alrededor de los restos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) en la cadena ligera y los restos FR de la cadena pesada se colocan alrededor de los restos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) en los restos de la cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de una CDR como se define por Kabat los de un bucle hipervariable, los restos de FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando la CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los restos de FR1 de la cadena pesada están en las posiciones 1-25 y los restos de FR2 están en las posiciones 36-49.

El término "especificidad" se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antígenicos a los que se puede unir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo tal como se describe en el presente documento. La especificidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo puede determinarse basándose en la afinidad y/o en la avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación (KD) de un antígeno con una proteína de unión a antígeno, es una medida de la fuerza de unión entre un determinante antígeno y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo: cuanto menor es el valor de la KD, más fuerte es la fuerza de unión entre un determinante antígeno y la molécula de unión a antígeno. Como alternativa, la afinidad también se puede expresar como la constante de afinidad (KA), que es $1/KD$. Como será evidente para el experto en la materia, la afinidad se puede determinar de una manera conocida per se, dependiendo del antígeno específico de interés. Por consiguiente, se dice que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo tal como se define en el presente documento es "específico para" una primera diana o antígeno en comparación con una segunda diana o antígeno cuando se une al primer antígeno con una afinidad (como se describió anteriormente, y se expresa adecuadamente, por ejemplo como un valor KD) que es al menos 10 veces, tal como al menos 100 veces, y preferentemente al menos 1000 veces, y hasta 10000 veces o mucho mejor que la afinidad con la que dicha secuencia de aminoácidos o polipéptido se une a otra diana o polipéptido.

Se pueden determinar las afinidades de anticuerpos, por ejemplo, mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo BIACORE descrito en la publicación de solicitud PCT N.º WO2005/012359); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo, RIA), por ejemplo. En ciertos aspectos descritos en el presente documento, un anticuerpo anti-CEACAM1 puede usarse como agente terapéutico en el direccionamiento y la interferencia con enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad de CECAM1. Asimismo, el anticuerpo anti-CEACAM1 puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico, o su eficacia como ayuda de diagnóstico, etc. Tales ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso previsto para el anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de inhibición HUVEC; los ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (véase, por ejemplo, el documento WO 89/06692); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y ensayos de citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) (Patente de EE.UU. N.º 5.500.362); y ensayos de actividad agonista o de hematopoyesis (véase el documento WO 95/27062). En el presente documento se describen otros ensayos de actividad biológica que pueden usarse para evaluar un anticuerpo anti-CEACAM 1.

La "avidéz" es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo descrito en el presente documento) y el antígeno pertinente. La avidéz está relacionada tanto con la afinidad entre un determinante antígeno y su sitio de unión al antígeno en la molécula de unión al antígeno, como al número de sitios de unión pertinentes presentes en la molécula de unión al antígeno. Normalmente, las proteínas de unión a antígeno (tales como un anticuerpo o una porción de un anticuerpo como se describe en el presente documento) se unirán a su antígeno afín o específico con una constante de disociación (KD) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, tal como 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, o 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (KA) de 10^5 a 10^{12} litros/mol o más, tal como 10^7 a 10^{12} litros/moles o 10^8 a 10^{12} litros/moles). Cualquier valor de KD mayor que 10^{-4} mol/litro (o cualquier valor de KA menor que 10^4 M⁻¹) generalmente se considera que indica unión no específica. La KD para las interacciones biológicas que se consideran significativas (por ejemplo, específicas) están normalmente en el intervalo de 10^{-10} M (0,1 nM) a 10^{-5} M (10000 nM). Cuanto más fuerte es una interacción, más baja es su KD. Por ejemplo, un sitio de unión en un anticuerpo o una porción del mismo descrito en el presente documento se unirá al antígeno deseado con una afinidad inferior a 500 nM, tal como menos de 200 nM o menos de 10 nM, tal como menos de 500 pM. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antígeno se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida per se, incluyendo, por ejemplo, el análisis de Scatchard y/o los ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición de tipo sándwich, y sus diferentes variantes conocidas per se en la técnica; así como otras técnicas como se menciona en el presente documento.

Por consiguiente, tal como se usa en el presente documento, "se une selectivamente" o "se une específicamente" se

refiere a la capacidad de un péptido de unión a anti-CEACM1 (por ejemplo, un anticuerpo recombinante o una porción del mismo) descrito en el presente documento para unirse a una diana, tal como una molécula presente en la superficie celular, con una KD de 10^{-5} M (10000 nM) o menos, por ejemplo, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o menos. La unión específica puede estar influida por, por ejemplo, la afinidad y avidéz del agente polipéptido y la concentración del agente polipéptido. El experto en la materia puede determinar las condiciones apropiadas bajo las cuales los agentes de polipéptidos descritos en el presente documento se unen selectivamente a las dianas usando cualquier método adecuado, tal como la titulación de un agente polipéptido en un ensayo de unión celular adecuado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "diana" se refiere a una molécula biológica (por ejemplo, péptido, polipéptido, proteína, lípidos, carbohidratos) a los que se puede unir selectivamente un dominio de polipéptidos que tiene un sitio de unión. La diana puede ser, por ejemplo, una diana intracelular (por ejemplo, una diana de proteína intracelular), una diana de superficie celular (por ejemplo, una proteína de membrana, una proteína receptora), tal como una proteína de superficie celular.

Tal como se describe en el presente documento, un "antígeno" es una molécula que está unida por un sitio de unión en un agente polipéptido, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo. Normalmente, los antígenos están unidos por ligandos de anticuerpos y son capaces de generar una respuesta de anticuerpos *in vivo*. Un antígeno puede ser un polipéptido, proteína, ácido nucleico u otra molécula. En el caso de anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos, el sitio de unión del anticuerpo según lo definido por los bucles variables (L1, L2, L3 y H1, H2, H3) es capaz de unirse al antígeno. El término "determinante antigénico" se refiere a un epítipo en el antígeno reconocido por una molécula de unión a antígeno, y más particularmente, por el sitio de unión a antígeno de dicha molécula.

Tal como se usa en el presente documento, un "epítipo" puede formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se mantienen al tratarlos con disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados mediante plegamiento terciario normalmente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Un "epítipo" incluye la unidad de estructura unida convencionalmente por un par de inmunoglobulina VH/VL. Los epítopos definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo y, por lo tanto, representan la diana de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de dominio único, un epítipo representa la unidad de estructura unida por un dominio variable de forma aislada. Las expresiones "determinante antigénico" y "epítipo" también pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que se genomanipulan o diseñan para que comprendan una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, una rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de Fv de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. véase Jones et al., 321 Nature 522 (1986); Riechmann et al., 332 Nature 323 (1988); Presta, 2 Curr. Op. Struct. Biol. 593 (1992). Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo humano compuesto" es un tipo específico de anticuerpo modificado o humanizado.

Un "anticuerpo humano", "anticuerpo humano no modificado" o "anticuerpo completamente humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que ha sido creado usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la materia. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos. Vaughan et al., 14 Nature Biotechnol. 309 (1996); Sheets et al., 95 PNAS 6157 (1998); Hoogenboom y Winter, 227 J. Mol. Biol. 381 (1991); Marks et al., 222 J. Mol. Biol., 581 (1991).

Los anticuerpos humanos también se pueden producir mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos de ratón se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el

ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.545.807; N.º 5.545.806; N.º 5.569.825; N.º 5.625.126; N.º 5.633.425; N.º 5.661.016; Marks et al., 10 Bio/Technology 779 (1992); Lonberg et al., 368 Nature 856 (1994); Morrison, 368 Nature 812 (1994); Fishwild et al., 14 Nat. Biotechnol. 845 (1996); Neuberger, 14 Nat. Biotechnol. 826 (1996); Lonberg y Huszar, 13 Intl. Rev. Immunol. 5 65 (1995). Como alternativa, el anticuerpo humano puede prepararse mediante la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies & Cancer Therapy 77 (Alan R. Liss, 1985); Boerner et al., 147 J. Immunol., 86 (1991); patente de EE.UU. n.º 5.750.373.

10 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dicha(s) alteraciones(s). Los anticuerpos madurados por afinidad preferentes tendrán afinidades nanomolar o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al., 1992, describe la maduración por afinidad mediante la combinación aleatoria de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los restos de CDR y/o marco se describe por: Barbas et al., 91 PNAS 3809 (1994); Schier et al., 169 Gene 147 (1995); Yelton et al., 155 J. Immunol. 1994 15 (1995); Jackson et al., 154 J. Immunol. 3310 (1995); Hawkins et al., 226 J. Mol. Biol. 889 (1992).

20 Un "sitio de unión a antígeno funcional" de un anticuerpo es uno que es capaz de unirse a un antígeno diana. La afinidad de unión al antígeno del sitio de unión al antígeno no es necesariamente tan fuerte como el anticuerpo parental del que se proviene el sitio de unión al antígeno, pero la capacidad de unirse al antígeno debe ser medible utilizando cualquiera de varios métodos conocidos para evaluar la unión del anticuerpo a un antígeno. Con el fin de seleccionar anticuerpos que se unen a un epítipo en un antígeno unido por un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, (Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Lab., 1988). Además, la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente en el presente documento no necesita ser cuantitativamente la misma. Para anticuerpos multiméricos, el número de sitios de unión a antígeno funcionales puede evaluarse usando análisis de ultracentrifugación tal como se describe en el Ejemplo 2 de la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. n.º 2005/0186208. De acuerdo con este método de análisis, se combinan diferentes proporciones de antígeno diana frente a anticuerpo multimérico y se calcula el peso molecular promedio de los complejos suponiendo diferentes números de 25 sitios de unión funcionales. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales reales obtenidos para evaluar el número de sitios de unión funcionales.

30 Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista específico de CEACAM1 se une a CEACAM1 e inhibe la actividad asociada a células tumorales de CEACAM1.

40 A menos que se indique otra cosa, la expresión "anticuerpo multivalente" se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva para denotar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente está diseñado para tener los tres o más sitios de unión al antígeno y generalmente no es un anticuerpo IgM o IgA de secuencia natural.

45 Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo designado es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

50 Tal como se usa en el presente documento, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie en la que uno o más de los restos de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie se han modificado. Dichos mutantes necesariamente tienen menos del 100 % de identidad de secuencia o similitud con el anticuerpo dependiente de la especie. En una realización, el mutante del anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 75 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo dependiente de la especie, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos un 90 % y, lo más preferentemente, al menos un 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo resto) o similares (es decir, resto de aminoácidos del mismo grupo basado en propiedades comunes de la cadena lateral, véase a continuación) con los restos de anticuerpos dependientes de la especie, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, delecciones o inserciones en N-terminal, 55 C-terminal o internas en la secuencia de anticuerpos fuera del dominio variable debería interpretarse como que afecta a la identidad o similitud de la secuencia.

60 Para aumentar la semivida de los anticuerpos o polipéptidos que contienen las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, se puede unir un epítipo de unión al receptor de rescate al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), tal como se ha descrito, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos. N.º 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión al receptor de salvamento puede unirse

en marco a un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptidos descrita en el presente documento, de modo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico diseñada comprende el epítipo de unión al receptor de rescate y una secuencia de polipéptidos descrita en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG (por ejemplo, Ghetie et al., 18 Ann. Rev. Immunol. 739 (2000)). También se describen anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas séricas aumentadas en el documento WO00/42072, WO 02/060919; Shields et al., 276 J. Biol. Chem. 6591 (2001); Hinton, 279 J. Biol. Chem. 6213-6216 (2004). En otra realización, la semivida sérica también se puede aumentar, por ejemplo, uniendo otras secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, los anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención se pueden unir a la albúmina sérica o una porción de albúmina sérica que se une al receptor FcRn o un péptido de unión a la albúmina sérica para que la albúmina sérica se una al anticuerpo o polipéptido, por ejemplo, tales secuencias de polipéptidos se desvelan en el documento WO 01/45746. En una realización, la semivida de un Fab aumenta con estos métodos. Véase también, Dennis et al., 277 J. Biol. Chem. 35035 (2002), para secuencias de péptidos de unión a albúmina sérica adicionales.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo según lo determinado por, por ejemplo, el método Lowry, o más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Por "porción" de un polipéptido, tal como un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo del mismo o un péptido de unión a antígeno, o una molécula de ácido nucleico que contiene al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de la longitud total de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Una porción puede contener 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600 o más nucleótidos, ambos incluidos; o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos o más, ambos incluidos.

La expresión "terapia antineoplásica" se refiere a una terapia útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos anticancerígenos incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, cirugía, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en radioterapia, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como los anticuerpos anti-HER-2 (por ejemplo, HERCEPTIN®), anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de la tirosina cinasa), inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, Erlotinib (TARCEVA®)), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, GLEEVECTM (mesilato de imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de las siguientes dianas ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o receptor(es) de VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Las combinaciones de los mismos también se incluyen en la invención.

La expresión "agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o produce la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque sin limitación, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una campototecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicamicina, especialmente calicamicina gamma 11 y calicamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, 33 Chem. Intl. Ed. Engl. 183 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una

esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSKh (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxana; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® sin cremóforo, formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas por ingeniería con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; GEMZAR® gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11) (incluido el régimen de tratamiento de irinotecán con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluyendo el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); lapatinib (TYKERB®); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (TARCEVA®)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® megestrol acetato, AROMASIN® exemestano, formestano, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de 1,3-dioxolano citosina; oligonucleótidos de antisentido, particularmente, los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de expresión de HER2; vacunas tales como vacunas para terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* y/o *in vivo*. Por consiguiente, el agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen los agentes de la vinca (vincristina y vinblastina), TAXOL®, e inhibidores de la topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en Murakami et al., Cell cycle regulation, oncogenes, & antineoplastic drugs, en MOLECULAR BASIS OF CANCER (Mendelsohn e Israel, eds., WB Saunders, Philadelphia (1995)).

El término "profármaco", tal como se usa en la presente solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, 14 Biochem. Soc. Transactions 375, 615th Meeting Belfast (1986); Stella et al., Prodrugs: Chem. Approach to Targeted Drug Deliv., en DIRECTED DRUG DELIVERY, (Borchardt et al., (ed.), Humana Press, 1985). Los profármacos descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, profármacos que contienen

fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco exento de citotoxicidad más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para su uso en conjunto con la presente invención incluye, aunque sin limitación, dichos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Por "radioterapia" se entiende el uso de rayos gamma dirigidos o rayos beta para inducir daño suficiente a una célula para limitar su capacidad de funcionar normalmente o destruir la célula por completo. Se apreciará que habrá muchas formas conocidas en la técnica para determinar la dosis y la duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se dan como una administración de una sola vez y las dosis típicas varían de 10 a 200 unidades (Grays) por día.

Por "reducir o inhibir" se entiende la capacidad de causar una disminución general de aproximadamente el 20 % o más, el 30 % o más, el 40 % o más, el 45 % o más, el 50 % o más, del 55 % o más, del 60 % o más, del 65 % o más, del 70 % o más, o del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. Reducir o inhibir puede referirse a, por ejemplo, los síntomas del trastorno que se está tratando, la presencia o el tamaño de metástasis o micrometástasis, el tamaño del tumor primario, la presencia o el tamaño del tumor latente.

La expresión "infusión intravenosa" se refiere a la introducción de un fármaco en la vena de un sujeto animal o humano durante un período de tiempo superior a aproximadamente 5 minutos, tal como entre aproximadamente 30 a 90 minutos, aunque, de acuerdo con la invención, la infusión intravenosa se administra alternativamente durante 10 horas o menos. El término "bolo intravenoso" o "push intravenoso" se refiere a la administración del fármaco en una vena de un animal o humano de tal manera que el cuerpo recibe el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, tal como 5 minutos o menos.

La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un medicamento debajo de la piel de un sujeto animal o humano, preferentemente dentro de un hueco entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración sostenida, relativamente lenta, desde un receptáculo de fármaco. El hueco se puede crear pellizcando o estirando la piel hacia arriba y lejos del tejido subyacente.

El término "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un medicamento debajo de la piel de un sujeto animal o humano, preferentemente dentro de un hueco entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración sostenida, relativamente lenta, desde un receptáculo de fármaco, durante un período de tiempo que incluye, pero sin limitación, 30 segundos o menos, o 90 segundos o menos. Opcionalmente, la infusión se puede realizar mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración de fármacos implantada bajo la piel del sujeto animal o humano, en donde la bomba suministra una cantidad predeterminada de fármaco durante un período de tiempo predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período de tiempo que abarca la duración del régimen de tratamiento.

El término "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de fármacos debajo de la piel de un sujeto animal o humano, donde la administración de fármacos en bolo es inferior a aproximadamente 15 minutos, tal como menos de 5 minutos o incluso menos de 60 segundos. La administración es preferiblemente dentro de un hueco entre la piel y el tejido subyacente, en donde se crea el hueco, por ejemplo, pellizcando o estirando la piel hacia arriba y lejos del tejido subyacente.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen dichas patologías que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen cáncer, particularmente el cáncer de páncreas.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el polipéptido. El marcador puede ser en sí mismo detectable (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Por "sujeto" se entiende un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un ser humano o un mamífero no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino, etc. Los individuos y los pacientes también son sujetos en el presente documento.

Cabe entender que la presente invención no se limita a una determinada metodología, protocolos y reactivos, etc., descritos en el presente documento y como tal puede variar. La terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define solamente por las reivindicaciones.

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas singulares incluyen la referencia plural

y viceversa a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Excepto en los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usadas en el presente documento deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

5 Todas las patentes y otras publicaciones identificadas tienen el propósito de describir y desvelar, por ejemplo, las metodologías descritas en tales publicaciones que podrían usarse en conexión con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a
10 sobre la fecha o la representación del contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método, dispositivos y materiales conocidos pueden usarse en la práctica o prueba de la invención, los métodos, dispositivos y materiales a este respecto se describen en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

20 El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

25 La **FIG. 1** demuestra que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano de ratón 5F4 protege a los ratones deficientes en Rag2 de la micrometástasis de la línea celular pancreática humana (AsPc-1). Se muestra la detección temprana de células tumorales AsPc1 con un método de fotosensibilización no invasivo después de la inyección intravenosa. La línea de células cancerosas de páncreas humano, AsPc-1 ($0,5 \times 10^6$ células), se administró mediante inyección en la vena de la cola. Después de 14 días, los animales recibieron una dosis oral de ácido delta-aminolevulínico (ALA; 100 mg/kg) 4-6 horas antes del sacrificio por eutanasia y análisis de
30 fluorescencia tisular. Después, los animales se mantuvieron en condiciones de luz tenue para evitar el blanqueo fotográfico y las reacciones fototóxicas. Las cavidades abdominal y torácica de los animales se examinaron inmediatamente bajo luz blanca y luego se iluminaron con luz UV (405 nm) para evaluar la presencia de tumores en el parénquima de los pulmones y los ganglios linfáticos como evidencia de metástasis. Obsérvese el pulmón hemorrágico en el control tratado con MOPC (arriba) pero el pulmón normal, no hemorrágico en el animal tratado con 5F4 (abajo), indicativo de lesión parenquimatosa debido a la presencia de células tumorales. El diagrama esquemático del metabolismo de ALA se muestra a la derecha.

Las **FIGS. 2A-2B** demuestran que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano de ratón 5F4 protege a los ratones deficientes en Rag2 de la micrometástasis de la línea celular pancreática humana (AsPc-1). Examen de pulmones 14 días después de la inoculación intravenosa de la línea celular AsPc1 como en la FIG. 1. La **FIG. 2A**
40 demuestra la capacidad de retención de agua. Los pulmones son lóbulos esponjosos dentro del pecho. La retención de agua es uno de los métodos de rutina para demostrar el daño pulmonar (por ejemplo, inflamación, edema, congestión). Para medir la retención de agua, se extirpó uno de los cinco lóbulos de animales tratados con MOPC y 5F4, se pesó y se mantuvo en un gabinete de desecación de vidrio durante 14-18 días. Después de la desecación, los pulmones se volvieron a pesar y la diferencia se muestra como porcentaje de pérdida de agua. Apenas hay pérdida de agua de los pulmones en los ratones tratados con 5F4, pero pérdida considerable de agua en los ratones tratados con MOPC-1. La **FIG. 2B** muestra pulmón colapsado en animales tratados con MOPC (15 ml cónico, derecha). Los pulmones poseen bolsas de aire. Los pulmones dañados a menudo tienen pérdida de
45 aire y elasticidad. El aire dentro de un pulmón normal produce una mayor flotabilidad. Para medir el daño pulmonar por flotabilidad, se extirparon cuatro de los cinco lóbulos de los animales tratados con anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano de ratón 5F4 (en este caso, el N.º 216, izquierda) y de animales tratados con MOPC (en este caso, el N.º 208, derecha), se enjuagaron con agua destilada y se hizo flotar en tampón PBS durante no menos de 2 horas. Los pulmones sanos flotan (tratados con anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano de ratón 5F4) y los pulmones colapsados (tratamiento con anticuerpos MOPC) se hunden.

La **FIG. 3** representa un modelo de metástasis *in vivo* utilizado en los experimentos descritos en el presente documento. La línea de células cancerosas de páncreas humano, AsPc-1, se estableció como xenoinjertos mediante inyección subcutánea en los flancos de ratones Rag2^{-/-}. El anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 de humano, 5F4 (200 µg/ratón) o IgG1 de ratón (MOPC, 200 µg) se administró por vía intraperitoneal 1 día antes, 2 días y 4 días y posteriormente cada 3 días después de la inoculación de las células tumorales durante los tiempos
50 indicados. Los ratones se sacrificaron a las 6 semanas después de la inoculación subcutánea para evaluar la metástasis tumoral y los volúmenes en el sitio de inoculación. Los volúmenes tumorales se calcularon como $\% \pi (L/2)^2 (H/2) (W/2)$ en donde W representa el ancho, H representa la altura y L representa la longitud.

Las **FIGS. 4A-4D** demuestran que el anticuerpo 5F4 descrito en el presente documento previene la metástasis de AsPc-1 a los ganglios linfáticos axilares después de la inoculación subcutánea tal como se describe en la FIG. 3. Los datos aquí muestran un análisis dos semanas después de la inoculación subcutánea. El análisis de FACS
65 reveló la presencia de células CEACAM1+ humanas en los GL axilares de ratones tratados con MOPC pero no en ratones tratados con 5F4 ya que el anticuerpo monoclonal 5F4 es específico para CEACAM1 humano pero no

reconoce CEACAM1 de ratón (n=3 por grupo) (FIGS. 4A y 4C). El análisis por PCR reveló niveles detectables de CEACAM1-L humano en los GL axilares de ratones tratados con MOPC pero no en ratones tratados con 5F4 (n=2 por grupo) (Figuras 4B y 4D). Bz, bazo. GL, ganglio linfático axilar. GLM, ganglios linfáticos mesentéricos.

Las **FIGS. 5A-5E** muestran que el anticuerpo 5F4 descrito en el presente documento previene la metástasis de AsPc-1 en la cavidad abdominal 14 días después de la inoculación subcutánea. Se observaron células de nódulos tumorales derivadas de AsPc-1 para estudiar el peritoneo en ratones *Rag2^{-/-}* tratados con MOPC (ratones 4/7; FIG. 5B) pero no en los tratados con 5F4 (ratones 0/7; FIG. 5A). La tinción con hematoxilina y eosina de los nódulos reveló la presencia de células AsPc-1 en ratones tratados con MOPC (25x, FIG. 5C y 100x, FIG. 5D). La cuantificación de estos resultados se muestra en la FIG. 5E.

Las **FIGS. 6A-6O** demuestran que el anticuerpo 5F4 descrito en el presente documento previene la metástasis de AsPc-1 en ratones *Rag2^{-/-}*. A los ratones *Rag2^{-/-}* se les administraron células AsPc-1 por vía subcutánea, como en la FIG. 3. Se administró MOPC (IgG 1 de ratón) o 5F4 por vía intraperitoneal en el programa descrito en la FIG. 3 y se evaluó a los ratones a las 6 semanas después de la inoculación. Los tumores visibles de AsPc-1 se localizaron en el sitio de inyección. El tumor localizado en el sitio de inyección se observó después del día 9 de la inoculación del tumor en ratones tratados con 5F4 (FIGS. 6A, 6C y 6E; flecha). El tumor en la inoculación de los animales tratados con MOPC se observó más tarde a los 28 días después de la inoculación y fue más grande (FIGS. 6B, 6D y 6F; las flechas indican tumor en el sitio de inoculación y metástasis peritoneales). La diseminación intraperitoneal solo se observó en ratones que recibieron MOPC (FIGS. 6D, 6F, 6L y 6O; las flechas indican metástasis asociadas con órganos tales como el páncreas (FIGS. 6L y 6O) y el estómago (FIG. 6O); las flechas indican metástasis al peritoneo en las FIGS. 6D, 6L y 6O). Se observaron vasos sanguíneos dentro del tumor en el sitio de inoculación en ratones tratados con MOPC (FIG. 6H) pero no en ratones tratados con 5F4 (FIG. 6G). Se observó tumor en la próstata (FIG. 6J) y el páncreas (FIGS. 6L y 6O) de ratones tratados con MOPC pero no en la próstata (FIG. 6I) o el páncreas (FIG. 6K) de ratones tratados con 5F4. Se observaron tumores en la pared del estómago (FIG. 6O, flecha superior) adyacente al tumor pancreático (FIG. 6O, flecha inferior). Se detectaron células tumorales en los GL mediastínicos (FIG. 6M, flecha) y pulmones (FIG. 6M, flecha) de ratones tratados con MOPC. La FIG. 6N muestra una vista de la cavidad abdominal 6 semanas después de la inoculación subcutánea de células AsPc1 tratadas 5 semanas con el anticuerpo monoclonal 5F4. No se observan metástasis.

La **FIG. 7** representa tumores subcutáneos macroscópicos representativos después de la inoculación subcutánea a las 6 semanas después de la inoculación. Los paneles superiores muestran tumores subcutáneos extirpados de los flancos de animales tratados con 5F4 y MOPC-1 en las pautas de tratamiento indicadas. Los paneles inferiores muestran secciones transversales horizontales de los mismos tumores de los animales experimentales indicados. Los paneles inferiores muestran una mayor necrosis de tumores en los ratones tratados con 5F4. Se muestran los volúmenes tumorales y se calcularon como $\frac{3}{4}\pi \cdot (L/2) \cdot (H/2) \cdot (W/2)$ donde W representa el ancho, H representa la altura y L representa la longitud y se muestra debajo de los tumores en mm³.

La **FIG. 8** muestra la patología de tumores subcutáneos en animales inoculados por vía subcutánea con AsPc-1 después de 6 semanas. Los tumores subcutáneos se componen de láminas y nidos de carcinoma mal diferenciados con características epitelioides y algunas vacuolas de mucina intracelular compatibles con adenocarcinoma. Muestran algunos cambios degenerativos y necrosis central que aumenta después de un tratamiento prolongado con 5F4, anticuerpo monoclonal específico de CEACAM1 humano.

La **FIG. 9** demuestra que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano 5F4 protege a los ratones deficientes en *Rag2* de la macrometástasis de la línea celular pancreática humana (AsPc-1) 6 semanas después de la inoculación subcutánea de células AsPc-1 en ratones *Rag2^{-/-}*. Los tumores metastásicos macroscópicos representativos después de la inoculación subcutánea solo se observan en animales tratados con MOPC. Cuatro y cinco semanas de tratamiento con anticuerpo monoclonal 5F4 fueron capaces de prevenir la metástasis como se muestra. Se observaron tumores en la pared del estómago adyacente al tumor pancreático metastásico y la cavidad peritoneal con invasión a los tejidos de la mucosa en los animales tratados con MOPC (como también se describe en la FIG. 6).

La **FIG. 10** muestra la patología de metástasis de células tumorales pancreáticas de propagación a larga distancia después de la inoculación subcutánea en ratones tratados con anticuerpo MOPC a las 6 semanas después de la inoculación. La patología de los tejidos individuales se muestra después de la tinción con hematoxilina y eosina. Las estrellas (*) indican el extenso crecimiento tumoral observado en ratones *Rag2^{-/-}* inmunodeficientes solo en el control de MOPC, pero no ratones tratados con 5F4. Se observó que las células humanas de cáncer de páncreas crecían en ratones *Rag2^{-/-}* y metastatizaban en la próstata, hígado, pulmón (10x aumentos), ganglio linfático mesentérico e intestino delgado (20x aumentos). Además, la invasión linfática de las células tumorales pancreáticas en el pulmón se observó en este modelo, como lo demuestran los asteriscos dobles (20x aumentos). Este último se muestra mediante tinción de inmunofluorescencia (citoqueratina, indicativa del tumor; LYVE-1, indicativo de vasos linfáticos).

La **FIG. 11** muestra la identificación de tumores metastásicos después de la inoculación subcutánea a las 6 semanas. Se muestran pulmones de animales tratados con MOPC y 5F4. El tumor solo se identificó en los animales tratados con MOPC, pero no 5F4, la administración como se revela por tinción con un marcador tumoral (citoqueratina). DAPI tiñe los núcleos.

Las **FIGS. 12A-12B** muestran la identificación por inmunofluorescencia de metástasis linfáticas después de la inoculación subcutánea. La **FIG. 12A** muestra la tinción específica para vasos linfáticos (marcador de endotelio de vasos linfáticos, Lyve-1) y células tumorales invasivas (citoqueratina) identificadas después del tratamiento con MOPC pero no con el tratamiento con 5F4. Las células tumorales estaban rodeadas por vasos linfáticos recién generados (tinción consistente con superposición entre estos dos marcadores). La **FIG. 12B** demuestra que no se

identificó ninguna tinción específica para los vasos linfáticos (marcador de endotelio de vasos linfáticos, Lyve-1) ni células tumorales (citoqueratina) después del tratamiento con 5F4.

Las **FIGS. 13A-13E** muestran la identificación por inmunofluorescencia de metástasis linfáticas después de la inoculación subcutánea. La **FIG. 13A** muestra el páncreas de animales tratados con 5F4. No fue identificable ninguna tinción específica para vasos linfáticos (marcador de endotelio de vasos linfáticos, Lyve-1) ni células tumorales (citoqueratina). Las **FIGS. 13B-13E** muestran páncreas de animales tratados con MOPC. Se identificó la tinción específica para vasos linfáticos (marcador de endotelio de vasos linfáticos, Lyve-1) y células tumorales invasivas (citoqueratina). En las **FIGS. 13D y 13E**, las células tumorales estaban rodeadas por vasos linfáticos recién generados.

La **FIG. 14** proporciona las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 33) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 26) de la cadena pesada del hibridoma 5F4/2C6/2H3.

La **FIG. 15** proporciona las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 34) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) de la cadena ligera del hibridoma 5F4/2C6/2H3.

La **FIG. 16** proporciona las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 35) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 28) de la cadena pesada del hibridoma 34B1/2E8/2E6.

La **FIG. 17** proporciona las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 36) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 29) de la cadena ligera del hibridoma 34B1/2E8/2E6.

La **FIG. 18** proporciona las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 37) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 30) de la cadena pesada del hibridoma 26H7/2H9/2E10.

La **FIG. 19** proporciona dos conjuntos de secuencias de ADN (SEQ ID NOS 38 y 39, respectivamente, en orden de aparición) y de aminoácidos (SEQ ID NOS 31 y 32, respectivamente, en orden de aparición) de la cadena ligera del hibridoma 26H7/2H9/2E10.

La **FIG. 20** representa un modelo terapéutico para el tratamiento del cáncer de páncreas con el anticuerpo monoclonal 5F4. Se inocularon 2×10^6 células AsPc1 por vía subcutánea en ratones *Ceacam1^{-/-}Rag2^{-/-}*. A los 12 días después de la inoculación del tumor y evidencia de un tumor palpable, la terapia con el anticuerpo monoclonal 5F4 se inició a 200 microgramos por inyección cada 2-3 días para un total de 6 inyecciones durante un período de 2 semanas. Durante este tiempo, el tamaño del nódulo tumoral subcutáneo local se midió tal como se muestra. MOPC (IgG1 de ratón) sirvió como control. Los animales tratados con MOPC, tal como se muestra con el ratón número 73 (triángulos), presentaban un crecimiento tumoral aumentado en relación con los ratones tratados con anticuerpo monoclonal 5F4 tal como se muestra con los ratones número 71 y 72 (cuadrado y círculo). Estos estudios demuestran la inhibición del crecimiento tumoral primario mediada por 5F4.

La **FIG. 21** demuestra que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo monoclonal 5F4 bloquea la enfermedad metastásica en los pulmones. Usando el protocolo descrito en la **FIG. 20**, se sacrificaron los ratones tratados con 5F4 y MOPC en el día 26. Se recogieron tejidos pulmonares y se tiñeron tejidos con hematoxilina y eosina después de la fijación con parafina. El examen microscópico de las secciones histológicas se examinó para determinar el número de focos tumorales demostrables en los pulmones, así como el tamaño del nódulo más grande identificado en el grupo tratado con 5F4 (n=4) y en el grupo tratado con MOPC (n=4). Como se puede observar, el tratamiento con 5F4 dio como resultado una disminución en el número y el tamaño de los nódulos metastásicos hacia los pulmones en ratones *Ceacam1^{-/-} X Rag2^{-/-}*.

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan nuevos anticuerpos recombinantes anti-CECAM1 y péptidos de unión anti-CEACAM1, y métodos para su uso en terapias de proliferación celular antitumoral y de invasividad antitumoral, tales como el tratamiento del cáncer, particularmente el cáncer de páncreas. Además, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a anti-CECAM y los anticuerpos recombinantes descritos en el presente documento son útiles en "aplicaciones teranósticas", por ejemplo, evaluación y métodos de obtención de imágenes, tales como diagnósticos complementarios para determinar la expresión de CEACAM1 en biopsias tumorales para identificar posibles respondedores para enfoques de medicina personalizada. La obtención de imágenes moleculares de tumorigénesis dirigidas a CEACAM1 que se puede utilizar, por ejemplo, en el control en serie de respuesta(s) a la terapia y detección *in vivo* de tumores. Además, tales diagnósticos proporcionan enfoques novedosos para terapias contra el cáncer para su uso en aplicaciones de medicina personalizada. Además, las composiciones que comprenden los péptidos de unión anti-CEACAM1 y los anticuerpos anti-CEACAM1 descritos en el presente documento son útiles como restos de direccionamiento para otras composiciones de diagnóstico y terapéuticas, en combinación con agentes de entrega como nanopartículas, polyplexos, micropartículas, etc. En particular, las presentes realizaciones proporcionan las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de anticuerpos anti-CEACAM1 específicos, que pueden usarse en varios péptidos de unión a CEACAM1.

Tal como se demuestra en el presente documento, la administración del anticuerpo anti-CEACAM-1, 5F4, evita el crecimiento del cáncer de páncreas y la metástasis a otros órganos, así como los ganglios linfáticos regionales, en un modelo murino de cáncer de páncreas. Por consiguiente, Las composiciones y métodos descritos en el presente documento son particularmente adecuados y útiles en el tratamiento, la inhibición y/o la prevención del cáncer de páncreas, y el tratamiento, la inhibición y/o la prevención de metástasis.

CEACAM1

El aumento de la evidencia clínica muestra que un alto nivel de expresión de CEACAM1 en tumores y linfocitos que se infiltran en tumores se correlaciona con un mal pronóstico y un alto riesgo de metástasis, aunque, paradójicamente, desde hace mucho tiempo se cree que la molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM1) actúa como un supresor tumoral.

La molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEA) (CEACAM1) es un miembro de la familia CEA de proteínas transmembrana similares a la inmunoglobulina (Ig). Beauchemin et al., 252 Exp. Cell Res. 243 (1999); Gray-Owen y Blumberg, 6 Nat. Rev. Immunol. 433 (2006). CEACAM1 se expresa constitutivamente en una amplia gama de tejidos y tipos de células. Su expresión en las células citolíticas naturales (NK, del inglés *Natural Killer*) y los linfocitos T es, sin embargo, inducida principalmente por las citocinas y la activación del receptor activador de la membrana. Azuz-Lieberman et al., 17 Int. Immunol. 837 (2005); Gray-Owen y Blumberg, 2006; Moller et al., 65 Int. J. Cancer 740 (1996); Nakajima et al., 168 J. Immunol. 1028 (2002); Singer et al., 168 J. Immunol. 5139 (2002). Cuando se expresa, CEACAM1 se caracteriza por un empalme de ARN alternativo significativo que lleva a 11 isoformas en humanos y al menos a 4 isoformas en ratones. Estas isoformas difieren en la longitud de la cola citoplasmática (CT, del inglés *cytoplasmic tail*) y el número de dominios extracelulares similares a Ig y se nombran en consecuencia. La mayoría de las isoformas de CEACAM1 poseen una CT larga (CEACAM1-L) o una CT corta (CEACAM1-S).

Las isoformas de CEACAM1-L predominan en las células NK y en los linfocitos T, y contienen dos motivos inhibidores del inmunorreceptor basados en tirosina (ITIM). Beauchemin et al., 14 Oncogene 783 (1997); Chen et al., 180 J. Immunol. 6085 (2008); Singer et al., 168 J. Immunol. 5139 (2002). Los estudios anteriores han demostrado que las isoformas de CEACAM1-L inhiben el complejo receptor de linfocitos T (TCR)/CD3, el receptor de linfocitos B (BCR) y las respuestas inmunitarias mediadas por el receptor de tipo Toll 2 (TLR-2). Boulton y Gray-Owen, 3 Nat. Immunol. 229 (2002); Chen et al., 86 J. Leukoc. Biol. 195 (2009); Chen et al., 2008; Lobo et al., 86 J. Leukoc. Biol. 205 (2009); Slevogt et al., 9 Nat. Immunol. 1270 (2008). En cada uno de estos casos, esta inhibición está relacionada mecánicamente con la fosforilación de los ITIM asociados a la CT de CEACAM1-L mediada por la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento o mediada por la Src cinasa, el reclutamiento de la fosfatasa homóloga a Src 1 (SHP-1) y/o SHP-2, y consecuentemente, la inhibición de elementos de señalización aguas abajo. Abou-Rjaily et al., 114 J. Clin. Invest. 944 (2004); Beauchemin et al., 1997; Chen et al., 2008; Huber et al., 274 J. Biol. Chem. 335 (1999); Izzi et al., 18 Oncogene 5563 (1999); Klaile et al., 187 J. Cell Biol. 553 (2009); Muller et al., 187 J. Cell Biol. 569 (2009); Najjar, 13 Metab. 240 (2002); Nouvion et al. 123 J. Cell Sci. 4421 (2010).

La expresión de CEACAM1, o la ausencia de ella, se ha asociado con varios tumores, especialmente aquellos de origen de células epiteliales (Obrink, 60 Lung Cancer 309 (2008)). Los primeros estudios reconocieron que los cánceres colorrectales esporádicos que se provienen de la transformación de las células epiteliales intestinales (IEC, del inglés *intestinal epithelial cells*) y los cánceres de próstata comúnmente no expresan CEACAM1, lo que indica que las isoformas de CEACAM1-L en epitelios cumplen una función supresora de tumores dado que las isoformas de la CT de CEACAM1-L se expresan comúnmente en células de epitelios y son normalmente inhibitorias. Hsieh et al., 41 Prostate 31 (1999); Izzi et al., 1999; Obrink, 2008; Rosenberg et al., 53 Cancer Res. 4938 (1993). De acuerdo con esto, el número y el tamaño del tumor aumentan en ratones Ceacam 1-/- expuestos a la administración de azoximetano (Leung et al., 25 Oncogene 5527 (2006)).

Al contrario de dichos estudios iniciales, sin embargo, numerosos estudios clínicos recientes en una amplia variedad de tumores humanos, incluido el melanoma (Gambichler et al., 131 Am. J. Pathol. 782 (2009); Markel et al., 59 Cancer Immunol. Immunother. 215 (2010)); y cánceres de pulmón (Dango et al., 60 Lung Cancer 426 (2008); Sienel et al., 9 Clin. Cancer Res. 2260 (2003); Xi et al., 36 Nucl. Acids Res. 6535 (2008)); páncreas (Simeone et al., 34 Pancreas 436 (2007)); vejiga (Tilki et al., 57 Eur. Urol. 648(2010)); colon (Kang et al., 22 Intl. J. Colorectal Dis. 869 (2007)); tiroides (Liu et al., 26 Oncogene 2747 (2007)); y próstata (Briese et al., 25 Intl. J. Gynecol. Pathol. 161 (2006)), han observado que los altos niveles de expresión de CEACAM1 en células tumorales o linfocitos que se infiltran en el tumor (TIL, del inglés *tumor-infiltrating lymphocytes*) (Markel et al., 177 J. Immunol. 6062 (2006)), se correlaciona directamente con mal pronóstico.

Es importante tener en cuenta que CEACAM1 también puede contribuir a otros efectos sobre los microambientes tumorales. Por ejemplo, la expresión de CEACAM1 por la neovasculatura puede promover la angiogénesis y facilitar la migración de tumores que llevan CEACAM1 a la sangre y/o los vasos linfáticos, posiblemente a través de interacciones homofílicas u otras, lo que indica que el bloqueo de estos inhibiría la progresión tumoral. Horst et al., 116 J. Clin. Invest. 1596 (2006); Wagener y Ergun, 261 Exp. Cell Res. 19 (2000); Zhou et al., 205 Pathol. Res. Pract. 483 (2009a); Zhou et al., 4 Nat. Immunol. 565 (2009b). Además, CEACAM1 puede regular negativamente varios receptores inmunes activadores en los linfocitos T (por ejemplo, receptor de IL-2 y TCR) (Chen et al., 2008; Lee et al., 180J. Immunol. 6827 (2008)), linfocitos B (BCR) (Lobo et al., 2009) y células epiteliales (EGFR y TLR2) (Slevogt et al., 9 Nat. Immunol. 1270 (2008)), que puede afectar aún más la inmunidad antitumoral en el entorno tumoral relevante.

Una característica común de todos los mecanismos mencionados anteriormente mediante los cuales CEACAM1 puede regular la inmunidad antitumoral a nivel del tumor mismo o de las células inmunitarias efectoras relevantes es a través de la expresión de una isoforma de CEACAM1 que contiene ITIM, capaz de asociarse con SHP-1. Debido a la capacidad de SHP-1 para inactivar una amplia variedad de moléculas enzimáticamente activas mediante la

desfosforilación de restos de tirosina (Lorenz, 228 Immunol. Rev. 342 (2009)), la asociación y regulación de SHP-1 por las isoformas de CEACAM1-L puede tener amplias implicaciones para la inmunidad antitumoral. Por ejemplo, en linfocitos T y NK, en los que SHP-1 generalmente se excluye de las estructuras de la balsa lipídica (Fawcett y Lorenz, 174 J. Immunol. 2849 (2005)), donde los receptores como el complejo TCR/CD3 y NKG2D normalmente residen durante la activación celular, CEACAM1 puede, sin pretender quedar ligados o limitados a teoría alguna, servir como un transbordador para transportar SHP-1 a este lugar para inactivar ZAP-70 (Chen et al., 2008), en el caso del complejo TCR/CD3, por desfosforilación de los correspondientes restos de tirosina. En este caso, la expresión de CEACAM1 en linfocitos T y células NK favorece el escape de las células tumorales de los mecanismos inmunes innatos y adaptativos. En comparación, el reclutamiento de SHP-1 en la proximidad de un receptor del factor de crecimiento asociado a la membrana celular, tal como EGFR, en una célula tumoral podría dar como resultado la inactivación de sus propiedades promotoras del crecimiento. Abou-Rjaily et al., 2004. Como tal, es concebible que las isoformas de CEACAM1-L muestren un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células tumorales. Por consiguiente, la capacidad de las isoformas de CEACAM1-L para asociarse con SHP-1 y dirigir esto a varios receptores diferentes de la superficie celular puede tener amplios efectos sobre el desarrollo de tumores primarios y la inmunidad antitumoral.

Antagonistas de CEACAM1 y anticuerpos anti-CEACAM1

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden antagonistas de CEACAM1 que son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con la actividad biológica de CEACAM1, tal como un anticuerpo anti-CEACAM1 o una porción del mismo que es específica para una diana de CEACAM 1, donde el anticuerpo anti-CEACAM 1 o una porción del mismo se une específicamente a la diana de CEACAM1. En algunas realizaciones, el CEACAM1 es el CEACAM1 humano. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CEACAM1 o porciones de los mismos que son útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une con suficiente afinidad y especificidad a CEACAM1, es decir, son específicos para CEACAM1 y pueden reducir o inhibir la actividad biológica de CEACAM1. En algunos aspectos, en el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-CEACAM1 o una porción del mismo que se une a CEACAM1 e inhibe la actividad biológica de CEACAM1 o bloquea la interacción de CEACAM1 con las células, tales como las células inmunológicas. La descripción adicional y los ejemplos de anticuerpos anti-CEACAM1 y porciones de los mismos útiles con las composiciones y métodos descritos en el presente documento, así como los métodos para hacer y caracterizar al mismo, son conocidos en la materia o se explican en el presente documento.

Anticuerpos anti-CEACAM1 y producción de anticuerpos

Se proporciona en el presente documento, en algunos aspectos, son anticuerpos anti-CEACAM1 humanos compuestos o humanizados o porciones de los mismos para su uso en las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino), tal como se usan en el presente documento, se refieren a anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima que proviene de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, una rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de Fv de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todos, al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Jones et al., 1986; Riechmann et al., 332 Nature 323 (1988); Presta, 2 Curr. Op. Struct. Biol. 593 (1992).

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; Verhoeven et al., 239 Science 1534 (1988)), sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedores por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos humanizados que comprenden uno o más dominios variables que comprenden la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, o SEQ ID NO: 30) y/o variables de cadena ligera (SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:29, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32) del anticuerpo anti-CEACAM1 5F4.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU tal como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), que también está disponible en la red informática mundial. El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humano.

Tal como se usa en el presente documento, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las porciones de las cadenas ligeras y pesadas de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) y Regiones Marco (FR). V_H se refiere al dominio variable de la cadena pesada. V_L se refiere al dominio variable de la cadena ligera. De acuerdo con los métodos usados en el presente documento, las posiciones de aminoácidos asignadas a CDR y FR se pueden definir de acuerdo con Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también está de acuerdo con la de Kabat.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los restos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión del antígeno. Cada dominio variable normalmente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de complementariedad puede comprender restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" tal como se define por Kabat (es decir, aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). En algunas realizaciones, una región determinante de complementariedad puede incluir aminoácidos de una región CDR definida de acuerdo con Kabat y un bucle hipervariable.

Además de la generación y producción a través de hibridomas, los anticuerpos o porciones de anticuerpos que se unen específicamente a CEACAM1 pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fago generados usando las técnicas descritas en McCafferty et al., 348 Nature 552 (1990); Clackson et al., 352 Nature, 624 (1991). Marks et al., 222 J. Mol. Biol. 581 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por intercambio de cadenas (Marks et al., 10 Bio/Technol. 779 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir grandes bibliotecas de fagos. Waterhouse et al., 21 Nuc. Acids. Res. 2265 (1993). Por consiguiente, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas del hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Las secuencias de ADN que codifican los anticuerpos o el fragmento de anticuerpo que se unen específicamente a CEACAM1 también se pueden modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en el lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison et al., 81 PNAS 6851 (1984)), o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina, como también se describe en otra parte del presente documento.

Un oligonucleótido adecuado, o conjunto de oligonucleótidos, que es capaz de codificar un péptido de los anticuerpos recombinantes específicos de CEACAM1 o porciones de los mismos (o que es complementario a dicho oligonucleótido, o conjunto de oligonucleótidos) se identifica (usando el procedimiento descrito anteriormente), se sintetiza e hibrida por medios bien conocidos en la materia, contra una preparación de ADN o de ADNc que proviene de células que son capaces de expresar anticuerpos anti-CEACAM1 o regiones variables o constantes de los mismos. Las moléculas oligonucleotídicas monocatenarias complementarias a las secuencias codificantes del péptido de la región anti-CEACAM1 "más probables" pueden sintetizarse usando procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase Belagaje et al., 254 J. Biol. Chem. 5765-80 (1979); Maniatis et al., en MOLEC. MECH. CONTROL GENE EXPRESSION (Nierlich et al., eds., Acad. Press, NY, 1976); Wu et al., 1978; Khorana, 203 Science 614-25 (1979).

Además, la síntesis de ADN se puede lograr mediante el uso de sintetizadores automáticos.

También se pretende que las regiones codificantes de anticuerpos para su uso en la presente invención también puedan proporcionarse alterando genes de anticuerpos existentes usando técnicas convencionales de biología molecular que dan como resultado variantes (agonistas) de los anticuerpos y péptidos descritos en el presente documento. Dichas variantes incluyen, pero sin limitación, delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos o péptidos anti-CEACAM1 recombinantes.

Además, los polipéptidos no de inmunoglobulina se pueden sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo, o se pueden sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un

anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

- Por consiguiente, se proporcionan en el presente documento, en algunos aspectos, anticuerpos anti-CEACAM1 humanizados o porciones de los mismos que comprenden o consisten en una secuencia de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones de estos aspectos, una o más regiones CDR de cadena pesada y/o de cadena ligera de un anticuerpo anti-CEACAM1 humanizado o una porción de unión a antígeno del mismo comprende o consiste en una secuencia de los anticuerpos descritos en el presente documento.
- Los aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 5F4/2C6/2H3 son SSHGMS (SEQ ID NO:1). Los aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 5F4/2C6/2H3 son TISSGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO:2). Los aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 5F4/2C6/2H3 son HDFDYDAAWFAY (SEQ ID NO:3).
- Los aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 5F4/2C6/2H3 son SANSSVSYMY (SEQ ID NO:4). Los aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 5F4/2C6/2H3 son LTSNLAS (SEQ ID NO:5). Los aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 5F4/2C6/2H3 son QQWSSNPPT (SEQ ID NO:6).
- Los aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 34B1/2E8/2E6 son SFYGMS (SEQ ID NO:7). Los aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 34B1/2E8/2E6 son TFSGGGNYTYYPDSVKG (SEQ ID NO:8). Los aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 34B1/2E8/2E6 son HGGLPFYAMDY (SEQ ID NO:9).
- Los aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 34B1/2E8/2E6 son SVSSSISSSNLH (SEQ ID NO:10). Los aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 34B1/2E8/2E6 son GTFNLAS (SEQ ID NO: 11). Los aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 34B1/2E8/2E6 son QQWSSHPFT (SEQ ID NO:12).
- Los aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10 son SDYYLY (SEQ ID NO:13). Los aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10 son TISVGGGNTSYPDSVKG (SEQ ID NO:14). Los aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10 son GLTTGPAWFAY (SEQ ID NO:15).
- Los aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10 (seq1) son KSSQSLLNSSNQKNYLA (SEQ ID NO:16). Los aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10 (seq1) son MÁS RÁPIDOS (SEQ ID NO:17). Los aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10 (seq1) son QQHYSTPWT (SEQ ID NO:18).
- Los aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10 (seq2) son RASQISGYLS (SEQ ID NO: 19). Los aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10(seq2) son AASTLDS (SEQ ID NO:20). Los aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 26H7/2H9/2E10(seq2) son LQYASSLMYT (SEQ ID NO:21).
- Por consiguiente, en algunos aspectos descritos en el presente documento, una o más regiones CDR de cadena pesada variable y/o una o más de cadena ligera de un anticuerpo anti-CEACAM1 humanizado o una porción del mismo comprende o consiste en una secuencia de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento.
- En algunas de dichas realizaciones, las una o más regiones variables CDR1 de cadena pesada comprenden un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:7 y la SEQ ID NO:13.
- En algunas de dichas realizaciones, la una o más regiones variables CDR2 de cadena pesada comprenden un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:14.
- En algunas de dichas realizaciones, las una o más regiones variables CDR3 de cadena pesada comprenden un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:9 y la SEQ ID NO:15.
- En algunas de dichas realizaciones, la una o más regiones variables CDR1 de cadena ligera comprenden un péptido con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 10, la SEQ

ID NO:16 y la SEQ ID NO:19.

En algunas de dichas realizaciones, la una o más regiones variables CDR2 de cadena ligera comprenden una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:17 y la SEQ ID NO:20.

En algunas de dichas realizaciones, la una o más regiones variables CDR3 de cadena ligera comprenden un péptido con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:18 y la SEQ ID NO:21.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, un anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humanizado comprende regiones marco de IgG1 humana mutadas y una o más regiones CDR de cadena ligera y/o una o más pesada del anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano 5F4, descritas en el presente documento, que bloquea la unión de CEACAM1 humano a sus ligandos. En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humanizado comprende regiones marco IgG4 humanas mutadas y una o más regiones CDR de cadena ligera y/o una o más pesada del anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 de murino 5F4, descritas en el presente documento, que bloquea la unión de CEACAM1 humano a sus ligandos.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, tales como las del anticuerpo 5F4 (SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, respectivamente), se seleccionan frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado. Sims et al., 151 J. Immunol. 2296 (1993); Chothia et al., 196 J. Mol. Biol. 901 (1987). Otro procedimiento usa una estructura concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., 89 PNAS 4285 (1992); Presta et al., 1993).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con la retención de una afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables, por ejemplo, las propiedades antitumorales o antimetastásicas del anticuerpo anti-CEACAM1 5F4 descrito en el presente documento. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles habitualmente y son familiares para aquellos expertos en la técnica. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales en tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de CDR están directamente, y más sustancialmente, implicados en la influencia de la unión a antígeno.

Como alternativa, es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal tendrá como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el desafío al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., 90 PNAS 2551 (1993); Jakobovits et al., 362 Nature 255 (1993); Bruggermann et al., 7 Yr. Immunol. 33 (1993); Duchosal et al., 355 Nature 258 (1992).

Como alternativa, se puede usar tecnología de expresión en fagos (McCafferty et al., 348 Nature 552 (1990)) para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína recubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por consiguiente, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión, véase, por ejemplo, Johnson et al., 3 Curr. Op. Str. Biol. 564 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson et al., 1991, aislaron una serie de diversos anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una biblioteca

combinatoria aleatoria pequeña de genes V procedentes de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks y col., 1991, o Griffith et al., 12 EMBO J. 725 (1993). Véase, *también*, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.565.332 y N.º 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante linfocitos B activados *in vitro* (véase las Patentes de EE.UU. N.º 5.567.610 y 5.229.275).

Anticuerpos humanos compuestos

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, la tecnología de anticuerpos humanos compuestos que genera anticuerpos humanos diseñados y desinmunizados al 100 % puede usarse para preparar anticuerpos anti-CEACAM1 "humanos compuestos" o "humanizados compuestos" para su uso en las composiciones y métodos descritos en el presente documento, usando, por ejemplo, una tecnología como la descrita por Antitope.

En resumen, tal como se usan en el presente documento, los "anticuerpos humanos compuestos" o los "anticuerpos humanizados compuestos" comprenden múltiples segmentos de secuencia ("compuestos") derivados de regiones V de anticuerpos humanos no relacionados que se seleccionan para mantener secuencias de anticuerpos monoclonales críticas para la unión al antígeno del precursor de partida de anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano, tal como el anticuerpo 5F4, y todos los cuales han sido filtrados por la presencia de posibles epítomos de linfocitos T utilizando "herramientas informáticas" (Holgate y Baker, 2009). El ajuste cercano de los segmentos de secuencia humana con todas las secciones de las regiones V de anticuerpos iniciales y la eliminación de los epítomos de linfocitos T CD4+ antes de la síntesis del anticuerpo permiten que esta tecnología evite la inmunogenicidad en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos 'humanos compuestos diseñados al 100 %' mientras se mantiene una afinidad y especificidad óptimas a través del análisis previo de las secuencias necesarias para la especificidad de antígeno (Holgate y Baker, 2009).

Por consiguiente, en algunas realizaciones, un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (V_H) seleccionada de los péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 30.

En algunas realizaciones, un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable (V_L) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 y la SEQ ID NO:32.

En algunas realizaciones, un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 puede incluir una región CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 puede incluir una región CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 comprende una región CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 comprende una región CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 comprende una región CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

Fragmentos de anticuerpo anti-CEACAM1

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, un anticuerpo recombinante específico para CEACAM1, tales como, por ejemplo: el anticuerpo anti-CEACAM1 5F4; un anticuerpo anti-CEACAM1 que comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:3; un anticuerpo anti-CEACAM1 que comprende una o más regiones CDR de cadena ligera que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO:5 y la SEQ ID NO:6; un anticuerpo compuesto anti-CEACAM1 humano o compuesto humanizado compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (V_H) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:26, la SEQ ID NO:28 y la SEQ ID NO:30; y/o un anticuerpo humano compuesto anti-CEACAM1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable (V_L) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 y la SEQ ID NO:32, puede tratarse o procesarse en un fragmento de anticuerpo del mismo.

Se han desarrollado diversas técnicas y están disponibles para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos provinieron de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Véase, por ejemplo, Morimoto et al., 24 J. Biochem. Biophys. Meths. 107 (1992); Brennan et al., 229 Science 81 (1985). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos citadas

en el presente documento. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., 1992). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica. En otras realizaciones, el fragmento anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase, por ejemplo, el documento WO 93/16185.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, un fragmento de anticuerpo humano específico de CEACAM1 es un fragmento Fab que comprende los dominios V_L, C_L, V_H y C_H1. Los fragmentos Fab comprenden o consisten esencialmente en un dominio variable y un dominio constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (C_H1) de la cadena pesada. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H se selecciona de los péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 30. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO:27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 y la SEQ ID NO:32. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L comprende una o más regiones CDR de cadena ligera que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20 y la SEQ ID NO:21.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, un fragmento de anticuerpo humano específico de CEACAM1 es un fragmento Fab', que se refiere a un fragmento Fab que tiene uno o más restos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio C_H1.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, un fragmento de anticuerpo humano específico de CEACAM1 es un fragmento Fd que comprende o que consiste esencialmente en los dominios V_H y C_H1. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H se selecciona de los péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 30. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, una porción de anticuerpo específico de CEACAM1 humano es un fragmento Fd' que comprende los dominios V_H y C_H1 y uno o más restos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio C_H1. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H se selecciona de los péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 30. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO:27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 y la SEQ ID NO:32. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L comprende una o más regiones CDR de cadena ligera que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20 y la SEQ ID NO:21.

Los fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios o scFv comprenden o consisten esencialmente en los dominios V_H y V_L del anticuerpo, de manera que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, un polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión a antígeno. Véase, por ejemplo, Pluckthun, 113 Pharmacology Monoclonal Antibodies 269 (Rosenburg y Moore, eds., Springer-Verlag, Nueva York, 1994). Por consiguiente, en algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, un fragmento de anticuerpo específico de CEACAM1 humano es un fragmento Fv que comprende o que consiste esencialmente en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO:28 y la SEQ ID NO:30. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO:27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 y la SEQ ID NO:32. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L comprende una o más regiones CDR de cadena ligera que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20 y la SEQ ID NO:21.

El término diacuerpos se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyas porciones comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera

(V_L) en la misma cadena de polipéptidos (V_H y V_L). Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger et al., 90 PNAS 6444 (1993).

Por consiguiente, en algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, una porción de anticuerpo específico de CEACAM1 humano es un diacuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno, que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptidos. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H se selecciona de los péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 30. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO:27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 y la SEQ ID NO:32. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L comprende una o más regiones CDR de cadena ligera que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20 y la SEQ ID NO:21.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, una porción de anticuerpo específico de CEACAM1 humano es un fragmento dAb que comprende o que consiste esencialmente en un dominio V_H. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H se selecciona de los péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 30. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, una porción de anticuerpo específico de CEACAM1 humano comprende o consiste esencialmente en una o más regiones CDR aisladas. En algunas de dichas realizaciones, la región CDR aislada comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15. En algunas de dichas realizaciones, la región CDR aislada comprende una o más regiones CDR de cadena ligera que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20 y la SEQ ID NO:21.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, la porción de anticuerpo humano específico de CEACAM1 es un fragmento F(ab')₂, que comprende un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra.

Los anticuerpos lineales se refieren a los anticuerpos tal como se describen en Zapata et al., Protein Engin., 8(10): 1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, un fragmento de anticuerpo específico de CEACAM1 humano es un anticuerpo lineal que comprende un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H se selecciona de los péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 30. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_H comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 y la SEQ ID NO:15. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO:27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 y la SEQ ID NO:32. En algunas de dichas realizaciones, el dominio V_L comprende una o más regiones CDR de cadena ligera que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20 y la SEQ ID NO:21.

En otras realizaciones de estos aspectos, una porción de anticuerpo humano recombinante específico de CEACAM1 tiene especificidad para el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 5F4, descrito en el presente documento, y producido por el hibridoma 5F4. En otras realizaciones de estos aspectos, una porción de anticuerpo humano recombinante específico de CEACAM1 tiene especificidad para el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 26H7, descrito en el presente documento, y producido por el hibridoma 26H7. En otras realizaciones de estos aspectos, una porción de anticuerpo humano recombinante específico de CEACAM1 tiene

especificidad para el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 34B1, descrito en el presente documento, y producido por el hibridoma 34B1.

Otras modificaciones de secuencia de aminoácidos

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos específicos para CEACAM1 descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos introduciendo los cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, especificidad de unión, inhibición de la actividad biológica. Los cambios de aminoácidos pueden alterar también los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glucosilación.

Las variantes de anticuerpos o péptidos anti-CEACAM 1 pueden ser completamente funcionales o pueden carecer de función en una o más actividades. Las variantes completamente funcionales normalmente contienen solo variaciones conservadoras o variaciones en restos no críticos o en regiones no críticas. Las variantes funcionales también pueden contener la sustitución de aminoácidos similares que no producen cambios o un cambio insignificante en la función. Como alternativa, tales sustituciones pueden afectar positiva o negativamente a la función en algún grado. Las variantes no funcionales normalmente contienen una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas, deleciones, inserciones, inversiones, o truncamiento o una sustitución, inserción, inversión o delección en un resto crítico o región crítica

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells, Science 244: 1081 (1989). En esta ocasión, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyeron por un aminoácido neutro o cargado negativamente (de forma típica alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por consiguiente, aunque se predetermine el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación per se no necesita determinarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo el barrido de ala o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se cribaron las variantes de anticuerpos expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo, tales como, por ejemplo, biotina.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR para su uso en los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos específicos para CEACAM1 descritos en el presente documento.

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de los anticuerpos o de los fragmentos de los anticuerpos específicos para CEACAM1 seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento (a) de la estructura principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (véase Lehninger, BIOCHEMISTRY (2ª ed., Worth Publishers, Nueva York, 1975): (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos: Asp (D), Glu (E); (4) básicos: Lys (K), Arg (R), Su (H). Por consiguiente, por ejemplo, la CDR1 de la cadena pesada 5F4 se puede representar como $X^2X^2X^4X^2X^1X^2$, en donde X^2 es Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), o Gln (Q); X^4 es Lys (K), Arg (R) o His (H); y X^1 es Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W) o Met (M).

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de

estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no esté involucrado en el mantenimiento de la conformación adecuada de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos específicos para CEACAM1 también puede ser sustituido, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el reticulado aberrante. A la inversa, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 5F4, o un anticuerpo humano compuesto o humanizado o un fragmento de anticuerpo específico para CEACAM1, tal como se proporciona en el presente documento). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando una biblioteca de presentación en fagos. En resumen, varios sitios en la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del paquete M13 en cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se seleccionan a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión del antígeno.

Como alternativa o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo o sus fragmentos de anticuerpo específicos para CEACAM1 y CEACAM1 humano. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a selección tal como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por "alteración del patrón de glucosilación original" se entiende la delección de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos normalmente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de la fracción de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por consiguiente, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de los mismos específicos para CEACAM1 se realiza alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unida al átomo de N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo. Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de EE.UU. N.º 2003/0157108; N.º 2004/0093621. Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 03/011878; la Patente de EE.UU. N.º 6.602.684. Los anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se recogen en el documento WO 97/30087. Véase también el documento WO 98/58964; El documento WO 99/22764 sobre anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos.

En algunas realizaciones, puede ser deseable modificar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos específicos para CEACAM1 descritos en el presente documento con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo del fragmento de anticuerpo del mismo. Como alternativa o de modo adicional, pueden introducirse uno o varios restos cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron et al., 176 J. Exp. Med. 1191 (1992); Shopes, 148 J. Immunol. 2918 (1992). Pueden prepararse también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., 53 Cancer Res. 2560 (1993). Como

alternativa, puede diseñarse mediante ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede de este modo potenciarse la lisis por el complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al., 3 Anti-Cancer Drug Design 219 (1989).

Por ejemplo, el documento WO 00/42072 describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, en el que los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc del mismo. Preferentemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de restos). normalmente, la región Fc alterada es una región Fc IgG1 que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones. Dichas sustituciones se combinan opcionalmente con sustituciones que aumentan la unión de C1q y/o CDC.

Se describen anticuerpos con unión C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas en el documento WO99/51642, las Patente de los Estados Unidos N.º 6.194.551, N.º 6.242.195, N.º 6.528.624 y N.º 6.538.124. Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos (numeración Eu de restos).

Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo específico para CEACAM1 descrito en el presente documento, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), se describen en el documento WO 00/42072 y en la Pub. de Patente de EE.UU. N.º 2005/0014934. Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 o 434 (numeración Eu de restos). La variante de anticuerpo que comprende la región Fc preferente con unión mejorada a FcRn comprende sustituciones de aminoácidos en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc de las mismas (numeración Eu de restos). En una realización, el anticuerpo tiene las mutaciones 307/434. También se contemplan anticuerpos diseñados específicamente para CEACAM1 con tres o más (por ejemplo, cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales. Véase, por ejemplo, La publicación de patente de Estados Unidos N.º US2002/0004587.

Producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos de los mismos

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), la mutagénesis mediante la RCP, y la mutagénesis de casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo.

Tradicionalmente, los anticuerpos monoclonales se han producido como moléculas naturales en líneas de hibridoma de murino. Además de esa tecnología, los métodos y las composiciones descritas en el presente documento proporcionan expresión de ADN recombinante de anticuerpos monoclonales. Esto permite la producción de anticuerpos humanizados, así como el espectro de derivados de anticuerpos y proteínas de fusión en una especie de hospedador de elección. La producción de anticuerpos en bacterias, levaduras, animales transgénicos y huevos de gallina también son alternativas para los sistemas de producción basados en hibridoma. Las principales ventajas de los animales transgénicos son los posibles altos rendimientos de fuentes renovables.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un anticuerpo, porción o polipéptido anti-CEACAM1 de la presente invención puede recombinarse con ADN vectorial de acuerdo con técnicas convencionales, incluyendo extremos con finales romos o finales escalonados para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según lo apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable y la ligadura con ligasas apropiadas. Se desvelan técnicas para tales manipulaciones, por ejemplo, por Maniatis et al., Molecular Cloning, Lab. Manual (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982 y 1989), y Ausubel, 1987, 1993, y puede usarse para construir secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de anticuerpo monoclonal o una región de unión a antígeno de la misma.

Una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, se dice que es "capaz de expresar" un polipéptido si contiene secuencias de nucleótidos que contienen información reguladora transcripcional y traduccional y tales secuencias están "operativamente unidas" a secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido. Una unión operativa es una unión en la que las secuencias reguladoras de ADN y la secuencia del ADN que se pretende expresar están conectadas de tal manera que permiten la expresión génica como péptidos anti-CPAA o porciones de anticuerpos en cantidades recuperables. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar de un organismo a otro, como es bien sabido en la técnica análoga. Véase, por ejemplo, Sambrook et

al., 1989; Ausubel et al., 1987-1993.

Por consiguiente, la expresión de un anticuerpo o péptido anti-CEACAM1 puede ocurrir en células procariotas o eucariotas. Los hospedadores adecuados incluyen hospedadores bacterianos o eucariotas, incluyendo levaduras, insectos, hongos, células de aves y de mamíferos, ya sea *in vivo* o *in situ*, o células hospedadoras de mamíferos, insectos, ave o levadura. La célula o tejido de mamífero puede ser de origen humano, de primate, hámster, conejo, roedor, vaca, cerdo, oveja, caballo, cabra, perro o gato, pero se puede usar cualquier otra célula de mamífero.

Además, mediante el uso de, por ejemplo, el sistema de ubiquitina hidrolasa de levadura, se puede lograr la síntesis *in vivo* de proteínas de fusión de ubiquitina-polipéptido transmembrana. Las proteínas de fusión así producidas pueden procesarse *in vivo* o purificarse y procesarse *in vitro*, permitiendo la síntesis de un anticuerpo anti-CEACAM 1 o una porción del mismo de la presente invención con una secuencia del extremo amino terminal especificada. Además, los problemas asociados con la retención de los restos de metionina derivados del codón de iniciación en la expresión directa de levadura (o bacteriana) pueden evitarse. Sabin et al., 7 Bio/Technol. 705 (1989); Miller et al., 7 Bio/Technol. 698 (1989).

Cualquiera de una serie de sistemas de expresión génica de levadura que incorporan elementos promotores y de terminación de los genes expresados activamente que codifican enzimas glucolíticas producidas en grandes cantidades cuando la levadura se cultiva en medios ricos en glucosa puede utilizarse para obtener anticuerpos o péptidos anti-CEACAM1 recombinantes de presente invención. Los genes glucolíticos conocidos también pueden proporcionar señales de control transcripcional muy eficaces. Por ejemplo, se pueden utilizar las señales promotoras y terminadoras del gen de la fosfoglicerato cinasa.

Se puede lograr la producción de anticuerpos anti-CEACAM1 o péptidos o derivados funcionales de los mismos en insectos. Por ejemplo, infectando el insecto hospedador con un baculovirus diseñado para expresar un polipéptido transmembrana por métodos conocidos por los expertos en la materia. Véase Ausubel et al., 1987, 1993.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos introducida se incorpora en un plásmido o vector vírico capaz de replicación autónoma en el hospedador receptor. Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de vectores para este propósito y son conocidos y están disponibles para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., 1987, 1993. Los factores de importancia en la selección de un plásmido o vector vírico particular incluyen: la facilidad con la que las células receptoras que contienen el vector pueden reconocerse y seleccionarse de aquellas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desean en un hospedador particular; y si es deseable poder "transportar" el vector entre células hospedadoras de diferentes especies.

Los vectores procariotas a modo de ejemplo conocidos en la técnica incluyen plásmidos tales como aquellos capaces de replicarse en *E. coli.*, por ejemplo. Otros elementos de expresión génica útiles para la expresión de ADNc que codifica anticuerpos o péptidos anti-CEACAM1 incluyen, pero no se limitan a (a) promotores de transcripción vírica y sus elementos potenciadores, tales como el promotor temprano SV40 (Okayama et al., 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983)), LTR del virus del sarcoma de Rous (Gorman et al., 79 PNAS 6777 (1982)) y LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (Grosschedl et al., 41 Cell 885 (1985)); (b) regiones de empalme y sitios de poliadenilación como los derivados de la región tardía SV40 (Okayama et al., 1983), y (c) sitios de poliadenilación como los de SV40 (Okayama et al., 1983).

Los genes de ADNc de inmunoglobulina se pueden expresar como se describe por Liu et al., citado más adelante, y Weidle et al., 51 Gene 21 (1987), utilizando como elementos de expresión el promotor temprano de SV40 y su potenciador, los potenciadores del promotor de la cadena H de inmunoglobulina de ratón, el empalme de ARNm de región tardía del SV40, secuencia de intervención de globina S de conejo, sitios de poliadenilación de inmunoglobulina y S globina de conejo, y los elementos de poliadenilación de SV40.

Para los genes de inmunoglobulina compuestos por parte de ADNc, parte del ADN genómico (Whittle et al., 1 Protein Engin. 499 (1987)), el promotor transcripcional puede ser citomegalovirus humano, los potenciadores del promotor pueden ser citomegalovirus e inmunoglobulina de ratón/humano, y las regiones de empalme y poliadenilación de ARNm pueden ser las secuencias de inmunoglobulina cromosómica naturales.

En algunas realizaciones, para la expresión de genes de ADNc en células de roedores, el promotor transcripcional es una secuencia vírica de LTR, los potenciadores del promotor transcripcional son uno o ambos del potenciador de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón y el potenciador vírico de LTR, la región de empalme contiene un intrón de más de 31 pb, y las regiones de poliadenilación y terminación de la transcripción provienen de la secuencia cromosómica natural correspondiente a la cadena de inmunoglobulina que se sintetiza. En otras realizaciones, las secuencias de ADNc que codifican otras proteínas se combinan con los elementos de expresión mencionados anteriormente para lograr la expresión de las proteínas en células de mamífero.

Cada gen fusionado se ensambla o se inserta en un vector de expresión. Las células receptoras capaces de expresar el producto del gen de la cadena de inmunoglobulina quimérica se transfectan individualmente con un péptido anti-CPAA o un gen que codifica la cadena H quimérica o L quimérica, o se cotransfectan con un gen de la cadena H

quimérica y L quimérica. Las células receptoras transfectadas se cultivan en condiciones que permiten la expresión de los genes incorporados y las cadenas de inmunoglobulina expresadas o los anticuerpos o fragmentos intactos se recuperan del cultivo.

- 5 En algunas realizaciones, los genes fusionados que codifican el péptido anti-CEACAM1 o las cadenas quiméricas H y L, o porciones de los mismos, se ensamblan en vectores de expresión separados que luego se usan para cotransfectar una célula receptora. Cada vector puede contener dos genes seleccionables, un primer gen seleccionable diseñado para la selección en un sistema bacteriano y un segundo gen seleccionable diseñado para la selección en un sistema eucariota, en donde cada vector tiene un par diferente de genes. Esta estrategia da como resultado vectores que
10 primero dirigen la producción y permiten la amplificación, de los genes fusionados en un sistema bacteriano. Los genes así producidos y amplificados en un hospedador bacteriano se usan posteriormente para cotransfectar una célula eucariota y permitir la selección de una célula cotransfectada que porta los genes transfectados deseados. Ejemplos no limitantes de genes seleccionables para su uso en un sistema bacteriano son el gen que confiere resistencia a la ampicilina y el gen que confiere resistencia al cloranfenicol. Los genes seleccionables para su uso en transfectantes eucariotas incluyen el gen de la xantina guanina fosforibosil transferasa (designado gpt) y el gen de fosfotransferasa de Tn5 (designado neo). Como alternativa, los genes fusionados que codifican las cadenas quiméricas H y L pueden ensamblarse en el mismo vector de expresión.

- 20 Para la transfección de los vectores de expresión y la producción de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos compuestos descritos en el presente documento, la línea celular receptora puede ser una célula de mieloma. Las células de mieloma pueden sintetizar, ensambla y secreta inmunoglobulinas codificadas por genes de inmunoglobulina transfectados y poseen el mecanismo para la glucosilación de la inmunoglobulina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula receptora es la célula de mieloma recombinante productora de Ig SP2/0 (ATCC N.º CRL 8287). Las células SP2/0 producen solo inmunoglobulina codificada por los genes transfectados. Las células de mieloma se
25 pueden cultivar en cultivo o en la cavidad peritoneal de un ratón, donde se puede obtener inmunoglobulina secretada del líquido ascítico. Otras células receptoras adecuadas incluyen células linfoides tales como linfocitos B de origen humano o no humano, células de hibridoma de origen humano o no humano, o células de heterohibridoma interespecies.

- 30 Un vector de expresión que lleva una construcción de anticuerpo o polipéptido quimérica, humanizada o compuesta humana o humanizada de anticuerpo anti-CEACAM1 descrita en el presente documento pueden introducirse en una célula hospedadora apropiada por cualquiera de varios medios adecuados, incluyendo medios bioquímicos como la transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio y aplicación con policones como el dietilaminoetil (DEAE) dextrano y medios mecánicos como la electroporación, microinyección directa y bombardeo con microproyectiles. Johnston et al., 240 Science 1538 (1988), tal como lo conoce un experto en la materia.

- 40 La levadura proporciona ciertas ventajas sobre las bacterias para la producción de cadenas de inmunoglobulina H y L. Las levaduras llevan a cabo modificaciones peptídicas postraduccionales, incluida la glucosilación. Existen varias estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y plásmidos de alto número de copias que pueden usarse para la producción de las proteínas deseadas en la levadura. La levadura reconoce secuencias líderes de productos génicos de mamíferos clonados y secreta péptidos que llevan secuencias líderes (es decir, prepeptidos). Hitzman et al., 11th Intl. Conf. Yeast, Genetics & Molec. Biol. (Montpelier, Francia, 1982).

- 45 Los sistemas de expresión génica en levadura pueden evaluarse rutinariamente para los niveles de producción, secreción y estabilidad de péptidos anti-CEACAM1, anticuerpos, y ensamblados quiméricos, anticuerpos humanos humanizados o compuestos, fragmentos y regiones de los mismos. Puede utilizarse cualquiera de una serie de sistemas de expresión génica en levadura que incorporan elementos promotores y de terminación de los genes expresados activamente que codifican enzimas glucolíticas producidas en grandes cantidades cuando las levaduras se cultivan en medios ricos en glucosa. Los genes glucolíticos conocidos también pueden proporcionar señales de control de transcripción muy eficaces. Por ejemplo, se pueden utilizar las señales promotoras y terminadoras del gen de la fosfoglicerato cinasa (PGK). Se pueden tomar varios enfoques para evaluar los plásmidos de expresión óptimos para la expresión de ADNc de inmunoglobulina clonada en levadura. Véase II DNA Cloning 45, (Glover, ed., IRL Press, 1985) y, por ejemplo, la Publicación de EE.UU. N.º US 2006/0270045 A1.

- 55 Las cepas bacterianas también se pueden utilizar como hospedadores para la producción de las moléculas de anticuerpo o péptidos descritos en el presente documento, cepas de *E. coli* K12 como *E. coli* W3110 (ATCC 27325), especies de *Bacillus*, se pueden usar enterobacterias tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescens*, y varias especies de *Pseudomonas*. Se usan vectores plasmídicos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora en conexión con estos hospedadores bacterianos. El vector lleva un sitio de replicación, así como genes específicos que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Se pueden tomar varios enfoques para evaluar los plásmidos de expresión para la producción de quiméricos, anticuerpos humanizados o humanizados compuestos y fragmentos de los mismos codificados por los ADNc o CDR de inmunoglobulina clonada en bacterias (véase Glover, 1985; Ausubel, 1987, 1993; Sambrook, 1989; Colligan, 1992-1996).

Las células hospedadoras de mamífero pueden crecer *in vitro* o *in vivo*. Las células de mamífero proporcionan modificaciones postraduccionales a las moléculas de proteína de inmunoglobulina, incluida la eliminación del péptido líder, el plegado y ensamblaje de cadenas H y L, la glucosilación de las moléculas de anticuerpo y la secreción de proteína de anticuerpo funcional.

5 Las células de mamíferos que pueden ser útiles como hospedadores para la producción de proteínas de anticuerpos, además de las células de origen linfóide descritas anteriormente, incluyen células de origen fibroblástico, tales como las células Vero (ATCC CRL 81) o CHO-K1 (ATCC CRL 61). Las células eucariotas a modo de ejemplo que se pueden usar para expresar polipéptidos incluyen, aunque sin limitación, células COS, incluyendo células COS 7; células 293, 10 incluyendo células 293-6E; células CHO, incluyendo células COS-S y DG44; células PER.C6.RTM (Crucell); y células NSO. En algunas realizaciones, se selecciona una célula hospedadora eucariota particular en función de su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales deseadas en las cadenas pesadas de anti-CEACAM1 y/o cadenas ligeras de anti-CEACAM1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células CHO producen polipéptidos que tienen un mayor nivel de sialilación que el mismo polipéptido producido en células 293.

15 En algunas realizaciones, pueden producirse uno o más polipéptidos anti-CEACAM1 *in vivo* en un animal que ha sido modificado genéticamente o transfectado con una o más moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, de acuerdo con cualquier método adecuado.

20 En algunas realizaciones, se produce un anticuerpo anti-CEACAM1 en un sistema libre de células. Se describen ejemplos de sistemas libres de células no limitantes, por ejemplo, en Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

25 Muchos sistemas de vectores están disponibles para la expresión de genes clonados de péptidos anti-CEACAM1 de cadena H y L en células de mamífero (véase Glover, 1985). Se pueden seguir diferentes enfoques para obtener anticuerpos H₂L₂ completos. Como se mencionó anteriormente, es posible coexpresar las cadenas H y L en las mismas células para lograr la asociación intracelular y la unión de las cadenas H y L en anticuerpos tetraméricos H₂L₂ completos y/o péptidos anti-CEACAM1 específicos. La coexpresión puede ocurrir usando el mismo o diferentes plásmidos en el mismo hospedador. Los genes para las cadenas H y L y/o los péptidos anti-CEACAM se pueden 30 colocar en el mismo plásmido, que luego se transfecta en células, seleccionando así directamente las células que expresan ambas cadenas. Como alternativa, las células pueden transfectarse primero con un plásmido que codifica una cadena, por ejemplo la cadena L, seguido de la transfección de la línea celular resultante con un plásmido de cadena H que contiene un segundo marcador seleccionable. Las líneas celulares productoras de péptidos y/o moléculas anti-CEAMCAM1 H₂L₂ a través de cualquier ruta podrían transfectarse con plásmidos que codifican copias 35 adicionales de péptidos, cadenas H, L o H más L junto con marcadores adicionales seleccionables para generar líneas celulares con propiedades mejoradas, tales como una mayor producción de moléculas de anticuerpos H₂L₂ ensambladas o una mayor estabilidad de las líneas celulares transfectadas.

40 Además, las plantas han surgido como sistemas de expresión alternativos convenientes, seguros y económicos para la producción de anticuerpos recombinantes, que se basan en el cultivo a gran escala de microbios o células animales. Los anticuerpos pueden expresarse en cultivo de células vegetales, o plantas cultivadas convencionalmente. La expresión en plantas puede ser sistémica, limitada a plastidios subcelulares, o limitada a semillas (endospermas). Véase, por ejemplo, La publicación de patente de Estados Unidos N.º 2003/0167531; las Patentes de los Estados Unidos N.º 6.080.560; N.º 6.512.162; el documento WO 0129242. Varios anticuerpos derivados de plantas han 45 alcanzado etapas avanzadas de desarrollo, incluyendo ensayos clínicos (véase, por ejemplo, Biolex, NC).

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos y sistemas para la producción de un anticuerpo humanizado, que se prepara mediante un proceso que comprende mantener un hospedador transformado con un primer vector de expresión que codifica la cadena ligera del anticuerpo humanizado y con un segundo vector 50 de expresión que codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado en condiciones tales que cada cadena se expresa y aislar el anticuerpo humanizado formado por el ensamblaje de las cadenas así expresadas. El primer y segundo vectores de expresión pueden ser el mismo vector. También se proporcionan en el presente documento secuencias de ADN que codifican la cadena ligera o la cadena pesada del anticuerpo humanizado; un vector de expresión que incorpora dicha secuencia de ADN; y un hospedador transformado con dicho vector de expresión.

55 Los expertos en la técnica pueden poner en práctica la generación de un anticuerpo humanizado a partir de las secuencias y la información proporcionada en el presente documento sin una experimentación excesiva. En un enfoque, hay cuatro etapas generales empleadas para humanizar un anticuerpo monoclonal, véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.585.089; N.º 6.835.823; N.º 6.824.989. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida; (2) 60 diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco de anticuerpos usar durante el proceso de humanización; (3) las metodologías/técnicas de humanización reales; y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado.

65 Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, la cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden recuperarse y purificarse mediante técnicas conocidas, por

ejemplo, inmunoabsorción o cromatografía de inmunoafinidad, métodos cromatográficos tales como HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), precipitación en sulfato de amonio, electroforesis en gel, o cualquier combinación de éstos. Véase, de manera general, Scopes, *PROTEIN PURIF.* (Springer-Verlag, NY, 1982). Son ventajosas las inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 % al 95 % de homogeneidad, como son aquellos con el 98 % al 99 % o más de homogeneidad, particularmente para usos farmacéuticos. Una vez purificado, parcialmente o a la homogeneidad que se desee, un anticuerpo humano compuesto humanizado puede usarse luego de manera terapéutica o en el desarrollo y la realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes, y similares. Véase, de manera general, Vols. I y II *Immunol. Meth.* (Lefkovits y Pernis, eds., Acad. Press, NY, 1979 y 1981).

Además, y como se describe en el presente documento, un anticuerpo humanizado recombinante puede optimizarse aún más para disminuir la posible inmunogenicidad, mientras se mantiene la actividad funcional, para terapia en humanos. En este sentido, actividad funcional se refiere a un polipéptido capaz de presentar una o más actividades funcionales conocidas asociadas con un anticuerpo de CEACAM1 recombinante de la invención. Dichas actividades funcionales incluyen actividad biológica y capacidad para unirse a un ligando para un anticuerpo anti-CEACAM1. Además, un polipéptido que tiene actividad funcional significa que el polipéptido exhibe una actividad similar, pero no necesariamente idéntica a, una actividad de un anticuerpo anti-CEACAM1 descrita en el presente documento, incluyendo formas maduras, tal como se mide en un ensayo particular, tal como, por ejemplo, un ensayo biológico, con o sin dependencia de la dosis. En el caso de que exista dependencia de la dosis, no necesita ser idéntico al del anticuerpo anti-CEACAM1, pero bastante sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con los anticuerpos anti-CEACAM1 de la presente invención (es decir, el polipéptido candidato presentará mayor actividad, o no más de aproximadamente 25 veces menos, aproximadamente 10 veces menos, o aproximadamente 3 veces menos actividad con respecto a los anticuerpos anti-CEACAM1 descritos en el presente documento, tales como 5F4).

Inmunoconjugados de anti-CEACAM1

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo y los fragmentos de anticuerpo específicos para CEACAM1 se conjugan con un agente tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas), una molécula pequeña, un ARNip, una nanopartícula, un agente de direccionamiento (por ejemplo, una microburbuja) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Dichos conjugados se citan en el presente documento "inmunoconjugados". Tales inmunoconjugados se pueden usar, por ejemplo, en métodos de diagnóstico, de terapéutico o de direccionamiento.

Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para, en particular, las células citotóxicas. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiانترacindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la invención incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se describen en el presente documento. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de la misma que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, el inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Hay varios radioisótopos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los conjugados de los anticuerpos específicos para CEACAM1 descritos en el presente documento y un agente citotóxico pueden prepararse usando cualquiera de varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidíoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos

de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta y col., 238 Science 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026.

En otras realizaciones, el anticuerpo específico de CEACAM1 o una porción del mismo puede conjugarse con un "receptor" (por ejemplo, estreptavidina) para su utilización en el redireccionamiento tumoral en la que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al sujeto, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente clarificador y después la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido). En algunas realizaciones, el anticuerpo específico de CEACAM1 o el fragmento de anticuerpo del mismo puede conjugarse con biotina, y el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo conjugado con biotina puede conjugarse o unirse adicionalmente a un agente unido a o recubierto con estreptavidina, como una microburbuja recubierta de estreptavidina, para su uso en, por ejemplo, la obtención de imágenes moleculares de la angiogénesis.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2.^a Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

Inmunoliposomas

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos específicos para CEACAM1 descritos en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y col., 82 PNAS 3688 (1985); Hwang et al., 77 PNAS 4030 (1980); y las Patentes de Estados Unidos N.º 4.485.045 y N.º 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se divulgan en la patente de EE.UU. n.º 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles, por ejemplo, mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la invención con los liposomas como se describe en Martin et al., 257 J. Biol. Chem. 286 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon et al., 81 J. Natl. Cancer Inst. 1484 (1989).

Las líneas de células hospedadoras que producen los anticuerpos recombinantes 5F4, 34B1 y 26H7 se mantienen y almacenan.

Usos terapéuticos y de diagnóstico de anticuerpos anti-CEACAM1 y porciones de unión a antígeno de los mismos

Tal como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos anti-CEACAM1 descritos en el presente documento son sorprendentemente eficaces para inhibir y prevenir la propagación del cáncer y las metástasis. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan nuevas composiciones farmacéuticas y métodos para inhibir y/o prevenir el cáncer, tales como el cáncer de páncreas, utilizando los anticuerpos anti-CEACAM1 recombinantes, quiméricos, humanizados y/o humanos compuestos descritos en el presente documento.

Las terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos para otras dianas se han introducido con éxito en la práctica clínica y proporcionan los beneficios de una mayor especificidad y un perfil de efectos secundarios más bajos en comparación con los medicamentos convencionales, en parte porque su modo de acción se basa en mecanismos antitumorales inmunológicos menos tóxicos, tales como la activación del complemento y el reclutamiento de células inmunes citotóxicas. Otras dianas para los anticuerpos que ya están aprobados o en desarrollo clínico para la terapia tumoral tienen cualidades distintas. En el caso de anticuerpos contra el proteoglicano MUC-1, un epítipo de repetición de péptido en la estructura principal de la diana está subglicosilado en células tumorales y, por lo tanto, alterado con respecto a su homólogo normal. En el caso de anticuerpos contra CD20 (rituximab), CD52 (Campath-1H) y CD22 (epratuzumab), las dianas de anticuerpos tienen niveles de expresión comparables en células tumorales y linfocitos normales. Otro ejemplo de accesibilidad diferencial de las dianas de anticuerpos es la carboanhidrasa IX (CA9).

Ocho anticuerpos han sido aprobados para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, la mayoría de ellos, sin embargo, en linfoma y leucemia (Adams, G. P. y Weiner, L. M. (2005) Nat. Biotechnol. 23, 1147-1157). Solo tres mAb,

a saber, Herceptina, Avastina y Erbitux, abordan los tipos de cáncer sólido, que representan más del 90 % de la mortalidad provocada por el cáncer. La sustancial necesidad médica restante, el beneficio clínico significativo que los anticuerpos monoclonales aprobados ya han proporcionado, y su considerable éxito comercial en conjunto demuestran la importancia de identificar y caracterizar nuevos fármacos basados en anticuerpos para el tratamiento e inhibición del cáncer (Brekke, O. H. y Sandlie, I. (2003) Nat. Rev. Drug Discov. 2, 52-62; Carter, P. (2001) Nat. Rev. Cancer 1, 118-129).

Por consiguiente, en algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de un cáncer o tumor que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CEACAM1 o una porción de anticuerpo del mismo. En algunas de tales realizaciones de estos métodos para tratar el cáncer, el anticuerpo anti-CEACAM1 o una porción de anticuerpo del mismo es un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo. La presente invención puede referirse al anticuerpo reivindicado para su uso en tales tratamientos. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo anti-CEACAM1 o la porción de anticuerpo comprende regiones CDR de cadena pesada que comprenden secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 3 y el anticuerpo anti-CEACAM1 o la porción de anticuerpo del mismo comprende regiones CDR de cadena ligera que comprenden secuencias SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, la enfermedad o trastorno es cáncer, particularmente el cáncer de páncreas. La inhibición del crecimiento de células tumorales usando las composiciones y métodos terapéuticos descritos en el presente documento en el sitio del tumor primario y en el sitio del tumor secundario sirven para prevenir y limitar la metástasis y la progresión de la enfermedad.

En algunas realizaciones de estos aspectos, el anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante es una porción de anticuerpo que tiene especificidad para el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 5F4, y producido por el hibridoma 5F4. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 es una porción de anticuerpo que comprende una o más secuencias de CDR de cadena pesada variable seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO:3 y/o una o más secuencias de CDR de cadena ligera variable seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 6 del anticuerpo monoclonal recombinante. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo es un fragmento Fab. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-CEACAM1 es un fragmento Fab'. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-CEACAM1 es un fragmento Fd. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-CEACAM1 es un fragmento Fd'. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo es un fragmento Fv. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo anti-CEACAM1 es un fragmento dAb. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-CEACAM1 comprende regiones CDR aisladas. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-CEACAM1 es un fragmento F(ab')₂. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-CEACAM1 es una molécula de anticuerpo de cadena sencilla. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-CEACAM1 es un diacuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-CEACAM1 es un anticuerpo lineal que comprende un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1).

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos, así como tumores latentes o micrometástasis. Por consiguiente, los términos "cáncer" o "tumor", tal como se usan en el presente documento, se refieren a un crecimiento descontrolado de células que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas corporales, incluyendo células madre cancerosas y nichos vasculares tumorales. Un sujeto que tiene un cáncer o un tumor es un sujeto que tiene células cancerosas objetivamente medibles presentes en el cuerpo del sujeto. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos, así como tumores latentes o micrometástasis. Los cánceres que migran desde su ubicación original y siembran órganos vitales pueden conducir a la muerte del sujeto a través del deterioro funcional de los órganos afectados. Los cánceres hematopoyéticos, tales como leucemia, son capaces de competir más que los compartimentos hematopoyéticos normales en un sujeto, lo que lleva a un fallo hematopoyético (en forma de anemia, trombocitopenia y neutropenia) que finalmente causa la muerte.

Tal como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos recombinantes anti-CEACMA1 o las porciones de anticuerpos de los mismos, descritas en el presente documento, son sorprendentemente eficaces en la inhibición y la prevención de metástasis de cáncer de páncreas. Por "metástasis" se entiende la propagación del cáncer desde su sitio primario a otros lugares del cuerpo. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo y crecer en un foco distante (metástasis) en tejidos normales en otras partes del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, dependiente de las células tumorales que se desprenden del tumor primario, que viaja a través del torrente sanguíneo y se detiene en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un suministro de sangre y pueden crecer para formar una masa potencialmente mortal. Las vías moleculares estimulantes e inhibitorias dentro de la célula tumoral regulan este comportamiento, y las interacciones entre la célula tumoral y las células hospedadoras en el sitio distante también son significativas.

Las metástasis se detectan con mayor frecuencia a través del uso exclusivo o combinado de imágenes de resonancia magnética (MRI), barrido por tomografía computarizada (CT), recuentos de sangre y plaquetas, estudios de función

hepática, radiografías de tórax y gammagrafías óseas además del seguimiento de síntomas específicos.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, un sujeto que tiene un cáncer o un tumor al que se le administra el anticuerpo anti-CEACAM1 o una porción de anticuerpo del mismo tiene o está en un mayor riesgo de tener cáncer de páncreas. El cáncer de páncreas es la cuarta causa principal de muerte por cáncer en los EE.UU. y provoca una estimación de 227000 muertes por año en todo el mundo. Los adenocarcinomas ductales pancreáticos evolucionan a través de lesiones precursoras no invasivas, más normalmente neoplasias intraepiteliales pancreáticas, adquiriendo alteraciones genéticas y epigenéticas seleccionadas clonalmente en el camino. Los cánceres de páncreas también pueden evolucionar a partir de neoplasias mucinosas papilares intraductales o neoplasias quísticas mucinosas. Los factores de riesgo para esta enfermedad maligna incluyen fumar, antecedentes familiares de pancreatitis crónica, edad avanzada, sexo masculino, diabetes mellitus, obesidad, grupo sanguíneo no O y exposiciones ocupacionales (por ejemplo, a disolventes de hidrocarburos clorados y níquel), origen étnico afroamericano, una dieta alta en grasas, dietas altas en carne y bajas en vegetales y folato, y posiblemente infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad periodontal (Vincent A, et al., Lancet. 13 de agosto de 2011;378(9791):607-20. Pancreatic cancer).

En algunas de dichas realizaciones, el sujeto que tiene o está en riesgo de cáncer de páncreas tiene cáncer de páncreas en etapa temprana. El cáncer de páncreas en estadio temprano generalmente es clínicamente silencioso, y la enfermedad generalmente solo se hace evidente después de que el tumor invade los tejidos circundantes o hace metástasis a órganos distantes.

En algunas de dichas realizaciones, el sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer de páncreas tiene una neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN). Tal como se usa en el presente documento, una neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) es un precursor neoplásico del adenocarcinoma invasivo del páncreas y son tumores microscópicos (<5 mm de diámetro) y no son directamente visibles por imágenes del páncreas. Los PanIN pueden albergar las alteraciones genéticas somáticas observadas en los cánceres pancreáticos invasivos, y la prevalencia de estas alteraciones genéticas aumenta a medida que aumenta la cantidad de atipia citológica y estructural en los PanIN. Los PanIN de bajo grado (PanIN 1) son muy comunes con el aumento de la edad y los PanIN de alto grado (PanIN 3) generalmente están presentes en pancreata con cáncer invasivo. El pancreata extirpado de individuos con antecedentes familiares fuertes de cáncer de páncreas generalmente tiene PanIN multifocales asociados con atrofia lobulocéntrica.

En algunas de dichas realizaciones, el sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer de páncreas tiene una neoplasia mucinosa papilar intraductal. Las neoplasias mucinosas papilares intraductales son un precursor menos frecuente del cáncer de páncreas invasivo, y son neoplasias quísticas grandes (≥5 mm) diagnosticadas cada vez más debido a las mejoras en la obtención de imágenes pancreáticas. Las neoplasias mucinosas papilares intraductales no invasivas se clasifican según la cantidad de displasia citológica y estructural, ya sea displasia de bajo grado, de grado intermedio o de alto grado (carcinoma in situ). Las tasas de curación son muy altas después de la extirpación de neoplasias mucinosas papilares intraductales que no tienen un cáncer de páncreas invasivo asociado pero, si se deja solo, estas lesiones pueden progresar a cánceres invasivos incurables. Las neoplasias mucinosas papilares intraductales pueden afectar a los conductos de las ramas pancreáticas, a conductos principales, o a ambos. La mayoría de las neoplasias mucinosas papilares intraductales asintomáticas pequeñas en los conductos de las ramas tienen un bajo potencial maligno, por lo tanto, se han desarrollado directrices internacionales para su gestión, y son conocidas por los expertos en la materia.

En algunas de dichas realizaciones, el sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer de páncreas tiene una neoplasia quística mucínica, que se compone de células epiteliales productoras de mucina y un estroma de tipo ovárico asociado. A diferencia de las neoplasias mucinosas papilares intraductales, las neoplasias quísticas mucinosas no se comunican con los conductos pancreáticos. Las neoplasias quísticas mucinosas surgen predominantemente en mujeres; aproximadamente un tercio de estos precursores neoplásicos tienen un carcinoma invasivo asociado.

En algunas de dichas realizaciones, el sujeto con mayor riesgo de cáncer de páncreas tiene antecedentes familiares de cáncer de páncreas. Un historial familiar de cáncer de páncreas es un factor de riesgo importante para la enfermedad; alrededor del 7-10 % de las personas afectadas tienen antecedentes familiares. El cáncer pancreático hereditario en la mayoría de los estudios se refiere a familias en las que un par de familiares de primer grado han sido diagnosticados con tumores pancreáticos. El análisis prospectivo de las familias con esta enfermedad maligna muestra que los familiares de primer grado de las personas con cáncer de páncreas hereditario tienen un riesgo nueve veces mayor de esta neoplasia sobre la población general. Este riesgo aumenta a 32 veces más en las familias con tres o más parientes de primer grado con cáncer de páncreas. Además, la evidencia indica que el riesgo de cáncer de páncreas aumenta modestamente en familiares de primer grado de pacientes con cáncer de páncreas esporádico en comparación con la población general. De parientes con cáncer pancreático hereditario, el riesgo es más alto en aquellos con un caso de cáncer de páncreas de inicio joven (edad <50 años) en la familia en comparación con aquellos sin un caso de inicio joven. Los pacientes con cáncer de páncreas hereditario también tienen más lesiones precancerosas que aquellos con tumores pancreáticos esporádicos y tienen un riesgo aumentado de desarrollar cánceres extrapancreáticos (Vincent A, et al., Lancet. 13 de agosto de 2011;378(9791):607-20. Pancreatic cancer).

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender además seleccionar primero, detectar o diagnosticar al sujeto que tiene o tiene mayor riesgo de tener cáncer de páncreas. En algunas de dichas realizaciones, el diagnóstico del sujeto puede comprender administrar al sujeto un anticuerpo anti-CEACAM1 o una porción de anticuerpo del mismo acoplado a un marcador, por ejemplo, un marcador radiactivo, o un marcador utilizado para la obtención de imágenes moleculares, tal como se describe en otras partes del presente documento. En dichas realizaciones, la detección del anticuerpo anti-CEACAM1 o la porción de anticuerpo marcado es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer o tumor.

En algunas de dichas realizaciones, el diagnóstico de mayor riesgo de cáncer de páncreas se puede determinar observando una o más mutaciones genéticas y/o afecciones de la enfermedad asociadas con un mayor riesgo de cáncer de páncreas. Los ejemplos no limitantes de mutaciones genéticas y/o de afecciones de la enfermedad asociadas con un mayor riesgo de cáncer de páncreas incluyen: mutaciones de la línea germinal en los genes BRCA2, PALB2, CDKN2A, STK11 y PRSS1, y síndrome de Lynch, que se asocian con un riesgo sustancialmente alto de cáncer de páncreas; las mutaciones del gen BRCA2 que representan la proporción más alta de causas conocidas de cáncer de páncreas hereditario y que se han identificado en el 5-17 % de las familias con cáncer de páncreas hereditario, y se asocian con el 10 % de los cánceres de páncreas no seleccionados, aparentemente esporádicos en la población de judíos Ashkenazi; las mutaciones de la línea germinal en PALB2 (socio y localizador de BRCA2) que se ha identificado como un gen de susceptibilidad de cáncer de páncreas y registrado en hasta el 3 % de los pacientes con cáncer de páncreas hereditario; mutaciones en el gen CDKN2A de la línea germinal, que se observan generalmente en familias con melanoma atípico hereditario de múltiples lunares; mutaciones en STK11 de la línea germinal, que se encuentran en pacientes con el síndrome de Peutz-Jeghers; mutaciones en PRSS1 de la línea germinal, que se encuentran en personas con pancreatitis hereditaria; pacientes de cáncer de colon hereditario sin poliposis, que tienen un modesto riesgo elevado de desarrollar cáncer de páncreas; y/o sujetos con grupo sanguíneo no O.

En algunas de dichas realizaciones, el diagnóstico de tener cáncer de páncreas o tener un mayor riesgo de cáncer de páncreas se puede determinar mediante un marcador sanguíneo asociado con el cáncer de páncreas que se puede medir de forma no invasiva.

En algunas de dichas realizaciones, El diagnóstico de cáncer de páncreas o de estar en mayor riesgo de tener cáncer de páncreas se puede determinar mediante una ecoendoscopia, que tiene la capacidad de detectar pequeñas lesiones preinvasivas, de aproximadamente 1 cm. Las lesiones preinvasivas focales evidentes por ecoendoscopia, tales como neoplasias mucinosas papilares intraductales, se pueden muestrear, por ejemplo, por aspiración con aguja fina.

En algunas de dichas realizaciones, el diagnóstico de tener cáncer de páncreas o de estar en mayor riesgo de tener cáncer de páncreas se puede determinar mediante una con protocolo trifásico de TC en páncreas.

En algunas realizaciones de estos métodos, un sujeto que ha sido diagnosticado con cáncer de páncreas o con un mayor riesgo de cáncer de páncreas puede someterse a una o más etapas o procedimientos adicionales para detectar metástasis. En algunas de dichas realizaciones, las una o más etapas adicionales para detectar metástasis comprenden la obtención de imágenes de tórax, por ejemplo, radiografía de pecho o CT, para detectar metástasis pulmonares. En algunas realizaciones, las una o más etapas adicionales para detectar metástasis comprenden PET CT. En algunas realizaciones, las una o más etapas adicionales para detectar la metástasis comprenden laparoscopia para detectar, por ejemplo, metástasis peritoneal.

En algunas realizaciones de estos métodos, un sujeto que ha sido diagnosticado con cáncer de páncreas o con un mayor riesgo de cáncer de páncreas puede someterse a una o más etapas o procedimientos adicionales para confirmar aún más la presencia de un tumor maligno. Por ejemplo, la confirmación citológica se puede hacer con ecoendoscopia o aspiración con aguja fina guiada por TC. Se ha documentado que la sensibilidad de la aspiración con aguja fina guiada por ecoendoscopia de masas pancreáticas es aproximadamente del 80 %. La identificación de la causa de las estenosis de los conductos biliares o pancreáticos puede requerir, en algunas realizaciones, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica y cepillados para diagnóstico citológico.

Un sujeto que tiene o está en un mayor riesgo de tener un cáncer de páncreas que se va a tratar usando las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede estadificarse adicionalmente según las directrices conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las pautas de estadificación clínica son las siguientes: cáncer de páncreas local o extirpable (aproximadamente 10 %, supervivencia media de 17 a 23 meses), que se puede subdividir en: Etapa 0 (Tis, N0, M0); Etapa IA (T1, N0, M0); Etapa IB (T2, N0, M0); Etapa IIA (T3, N0, M0); y Etapa IIB (T1, N1, M0; T2, N1, M0; T3, N1, M0); Cáncer de páncreas extirpable límite (10 %, media de supervivencia de hasta 20 meses), que se refiere a la enfermedad en estadio 3 con pilar tumoral o <180° de circunferencia de la arteria mesentérica superior o las arterias celíacas, o un segmento corto de la arteria hepática o la vena mesentérica superior, vena pulmonar o confluencia de estas venas; Cáncer de páncreas localmente avanzado o inextirpable (aproximadamente 30 %, media de supervivencia 8-14 meses); Cáncer de páncreas en estadio III (T4, cualquier N, M0, donde el recubrimiento tumoral > 180° de circunferencia de la arteria mesentérica superior o arterias celíacas, cualquier compromiso venoso irreconstruible; y metastásico (alrededor del 60 %, media de supervivencia 4-6 meses); y cáncer de páncreas en estadio IV (cualquier N, M1), donde T = tumor primario y TX indica que el tumor primario no puede evaluarse; T0 indica que no hay evidencia de tumor primario; Esto indica carcinoma in situ (incluye

la clasificación PanIN 3); T1 indica tumor restringido al páncreas, ≤ 2 cm de mayor dimensión; T2 indica tumor restringido al páncreas, > 2 cm de mayor dimensión; T3 indica que el tumor se extiende más allá del páncreas, sin afectación del eje celiaco o la arteria mesentérica superior (o extensión a la vena porta o la arteria mesentérica superior, pero aún extirpable); y T4 indica que el tumor afecta al eje celiaco o la arteria mesentérica superior (tumor primario no extirpable); donde N = ganglio linfático regional y NX indica que no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales; N0 indica que no hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales; y N1 indica metástasis en los ganglios linfáticos regionales; y donde M = metástasis a distancia y M0 indica que no hay metástasis a distancia y M1 indica metástasis a distancia.

10 *Eficacia del tratamiento divulgado en el presente documento*

La eficacia de los métodos de tratamiento para el cáncer, tales como el cáncer de páncreas, que comprende formulaciones terapéuticas de las composiciones que comprenden los antagonistas específicos de CEACAM1 descritos en el presente documento pueden medirse mediante diversos criterios de valoración comúnmente utilizados en la evaluación de tratamientos contra el cáncer, incluyendo, pero sin limitación, la regresión tumoral, contracción del peso o tamaño del tumor, el tiempo hasta la progresión, la duración de la supervivencia, la supervivencia libre de progresión, tasa de respuesta general, duración de la respuesta y la calidad de vida. Debido a que los antagonistas específicos de CEACAM1, por ejemplo, anticuerpos anti-CEACAM1 recombinantes y porciones de los mismos, descritos en el presente documento, representan una clase única de medicamentos contra el cáncer, por lo tanto, pueden requerir medidas y definiciones únicas de respuestas clínicas a los medicamentos. En el caso de los cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo recombinante de CEACAM1 o una porción del mismo puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el anticuerpo CEACAM1 recombinante o una porción del mismo actúan para prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse evaluando la duración de la supervivencia, la duración de la supervivencia libre de progresión (PFS, del inglés *progression free survival*), las tasas de respuesta (RR, del inglés *response rates*), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

En aquellas realizaciones relacionadas con el tratamiento o la prevención del cáncer de páncreas, los síntomas asociados con el cáncer de páncreas incluyen, aunque sin limitación, dolor abdominal o medio de la espalda, ictericia obstructiva y pérdida de peso. La pérdida de peso puede surgir de la anorexia, mala digestión por obstrucción ductal pancreática y caquexia. Ocasionalmente, La obstrucción del conducto pancreático puede provocar ataques de pancreatitis. La trombosis venosa profunda y superficial es, en algunas realizaciones, también un síntoma de cáncer de páncreas y puede ser un signo de enfermedad maligna. La obstrucción de la salida gástrica con náuseas y vómitos a veces ocurre con una enfermedad más avanzada. En algunas realizaciones, los síntomas del cáncer de páncreas que se inhibirán o tratarán usando las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, pancreatitis y depresión. En algunas realizaciones, los síntomas del cáncer de páncreas que se inhibirán o tratarán usando las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, diabetes mellitus y/o intolerancia a la glucosa.

En otras realizaciones, en el presente documento se describen métodos para aumentar la supervivencia libre de progresión de un sujeto humano susceptible o diagnosticado con un cáncer, como el cáncer de páncreas. El tiempo hasta la progresión de la enfermedad se define como el tiempo desde la administración del medicamento hasta la progresión de la enfermedad o la muerte. En una realización preferida, el tratamiento combinado usando un antagonista específico de CEACAM1, tales como un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, y uno o más agentes quimioterapéuticos puede aumentar significativamente la supervivencia libre de progresión en al menos aproximadamente 1 mes, 1,2 meses, 2 meses, 2,4 meses, 2,9 meses, 3,5 meses, tal como por aproximadamente 1 a aproximadamente 5 meses, en comparación con un tratamiento con quimioterapia sola. En otra realización, los métodos descritos en el presente documento pueden aumentar significativamente las tasas de respuesta en un grupo de sujetos humanos susceptibles o diagnosticados con un cáncer que son tratados con diversos agentes terapéuticos. La tasa de respuesta se define como el porcentaje de sujetos tratados que respondieron al tratamiento. En una realización, el tratamiento combinado descrito en el presente documento usando un antagonista específico de CEACAM1, tal como un anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o una porción del mismo, y uno o más agentes quimioterapéuticos aumentan significativamente la tasa de respuesta en el grupo de sujetos tratados en comparación con el grupo tratado con quimioterapia sola.

Para terapias contra el cáncer de páncreas, la CT es el método estándar para medir la carga tumoral, y los ensayos clínicos generalmente usan los criterios RECIST (criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos) para medir la respuesta tumoral. En algunas realizaciones relacionadas con el tratamiento del cáncer de páncreas, las concentraciones de CA19-9 en serie se pueden usar para predecir la respuesta al tratamiento o la recaída de la enfermedad. En algunas realizaciones, las mediciones de cantidades de ADN mutante en plasma pueden usarse para representar la carga tumoral y la respuesta al tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" "que trata" o "mejora" se refieren a tratamientos terapéuticos, en donde el objetivo es revertir, aliviar, recuperar, inhibir, ralentizar o detener la progresión o la gravedad de una afección asociada con, una enfermedad o trastorno. El término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno asociado con una condición inmune crónica, tal como, pero sin limitación, Una infección crónica o un cáncer. El tratamiento generalmente es "eficaz" si se reducen uno o más síntomas o marcadores clínicos. Como alternativa, el tratamiento es "eficaz" si la progresión de una enfermedad se reduce o se detiene. Esto es, "tratamiento" incluye no solo la mejora de los síntomas o marcadores, sino también un cese de al menos la desaceleración del progreso o el empeoramiento de los síntomas que se esperarían en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque sin limitación, alivio de uno o más síntomas, la disminución del grado de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, no empeorado), retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El término "tratamiento" de una enfermedad también incluye el alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluido el tratamiento paliativo).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de una cantidad eficaz de los anticuerpos recombinantes anti-CEACAM1 o porciones de los mismos, descritos en el presente documento, a un sujeto con el fin de aliviar un síntoma de un cáncer, como el cáncer de páncreas. Tal como se usa en el presente documento, "aliviar un síntoma de un cáncer" es mejorar o reducir cualquier afección o síntoma asociado con el cáncer. En comparación con un control equivalente sin tratar, tal reducción o grado de prevención es al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 %, o el 100 % tal como se mide mediante cualquier técnica convencional. En el mejor de los casos, el cáncer se elimina por completo según lo detectado por cualquier método estándar conocido en la técnica, en cuyo caso se considera que el cáncer ha sido tratado. Un paciente que está siendo tratado por un cáncer es aquel a quien un médico ha diagnosticado que tiene tal condición. El diagnóstico puede hacerse por cualquier medio adecuado. El diagnóstico y el control pueden implicar, por ejemplo, detectar el nivel de células cancerosas en una muestra biológica (por ejemplo, una biopsia de tejido o ganglio linfático, análisis de sangre o análisis de orina), detectar el nivel de un marcador sustituto del cáncer en una muestra biológica, detectar síntomas asociados con el cáncer específico o detectar células inmunes involucradas en la respuesta inmune típica de dicho cáncer.

El término "cantidad eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo necesaria para aliviar al menos uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y se refiere a una cantidad suficiente de composición farmacológica para proporcionar el efecto deseado, es decir, inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por lo tanto, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo usando los métodos descritos en el presente documento, que es suficiente para efectuar un efecto particular cuando se administra a un sujeto típico. Una cantidad eficaz tal como se usa en el presente documento también incluiría una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el curso de una enfermedad sintomática (por ejemplo, entre otros, ralentizar la progresión de un síntoma de la enfermedad) o revertir un síntoma de la enfermedad. Por consiguiente, no es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Para cualquier caso dado, sin embargo, puede determinarse una "cantidad eficaz" adecuada por un experto en la materia usando únicamente experimentación rutinaria.

Las cantidades eficaces, la toxicidad y la eficacia terapéutica se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones y métodos que exhiben grandes índices terapéuticos. Se puede estimar una dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Asimismo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo), que logra una inhibición de síntomas semimáxima como se determina en cultivo celular, o en un modelo animal apropiado. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Los efectos de cualquier dosis particular se pueden controlar mediante un bioensayo adecuado. La dosis puede ser determinada por un médico y ajustada, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento.

Modos de administración

Los agentes antagonistas específicos de CEACAM1, tales como anticuerpos recombinantes anti-CEACAM1 o porciones de anticuerpos de los mismos, descritos en el presente documento, pueden administrarse a un sujeto que lo necesite por cualquier vía apropiada que resulte en un tratamiento eficaz en el sujeto. Tal como se usa en el presente documento, los términos "administración", e "introducción" se usan indistintamente y se refieren a la colocación de un anticuerpo anti-CEACAM1 o una porción de anticuerpo del mismo en un sujeto mediante un método o vía que da como resultado una localización al menos parcial de tales agentes en un sitio deseado, tal como un sitio de inflamación o cáncer, tal que se produzca un efecto o efectos deseados.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo se administra a un sujeto que tiene un cáncer, tales como el cáncer de páncreas, que se va a inhibir por cualquier modo de administración que suministre el agente sistémicamente o a una superficie o diana deseada, y puede incluir, aunque no de forma limitativa, inyección, infusión, instilación y administración por inhalación. En la medida en que los anticuerpos anti-CEACAM1 o sus fragmentos de anticuerpos puedan protegerse de la inactivación en el intestino, también se contemplan formas de administración oral. "Inyección" incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal e inyección e infusión intraesternal. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-CEACAM1 o sus fragmentos de anticuerpos para su uso en los métodos descritos en el presente documento se administran mediante infusión o inyección intravenosa.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración que no sean la administración enteral y tópica, generalmente por inyección. Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se usa en el presente documento se refieren a la administración del agente de polipéptido biespecífico o multiespecífico distinto de directamente en un sitio diana, tejido u órgano, tal como un sitio tumoral, de manera que entra en el sistema circulatorio del sujeto y, por lo tanto, se somete al metabolismo y otros procesos similares.

Los antagonistas específicos de CEACAM1 descritos en el presente documento se administran a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. La administración local, por ejemplo, a un tumor o sitio de cáncer donde está ocurriendo la angiogénesis, es particularmente deseable si se asocian efectos secundarios o toxicidad extensivos con el uso del antagonista de CEACAM1. También se puede usar una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas en algunas realizaciones. Las estrategias *ex vivo* implican la transfección o transducción de células obtenidas de un sujeto con un polinucleótido que codifica un antagonista de CEACAM1. Las células transfectadas o transducidas se devuelven al sujeto. Las células pueden ser de una amplia gama de tipos, incluidos, sin limitación, células hematopoyéticas (por ejemplo, células de la médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

En algunas realizaciones, cuando el antagonista específico de CEACAM1 es un anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o una porción del mismo, el anticuerpo o parte del mismo se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si lo desea para el tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo se administra adecuadamente mediante infusión de pulso, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

En algunas realizaciones, el compuesto antagonista específico de CEACAM1 se administra localmente, por ejemplo, por inyecciones directas, cuando el trastorno o la ubicación del tumor lo permite, y las inyecciones pueden repetirse periódicamente. El antagonista específico de CEACAM1 también puede administrarse sistémicamente al sujeto o directamente a las células tumorales, por ejemplo, a un tumor o lecho tumoral después de la extirpación quirúrgica del tumor, para prevenir o reducir la recurrencia local o metástasis, por ejemplo de un tumor latente o micrometástasis.

Los métodos de sonoporación dirigidos a anticuerpos se contemplan para su uso en algunas realizaciones de los métodos para inhibir tumores descritos en el presente documento, con el fin de mejorar la eficacia y la potencia de las composiciones terapéuticas que comprenden anticuerpos recombinantes anti-CEACAM1 y porciones de los mismos proporcionados en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, "sonoporación" se refiere al uso del sonido, preferiblemente a frecuencias ultrasónicas, o la interacción del ultrasonido con agentes de contraste (por ejemplo, microburbujas estabilizadas) para modificar temporalmente la permeabilidad de las membranas plasmáticas celulares, permitiendo así la absorción de moléculas grandes, tales como agentes terapéuticos. La permeabilidad de la membrana causada por la sonoporación es transitoria, dejando a los agentes atrapados dentro de la célula después de la exposición al ultrasonido. La sonoporación emplea cavitación acústica de microburbujas para mejorar el suministro de moléculas grandes.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de los métodos, agentes terapéuticos anti-CEACAM1, tales como los anticuerpos anti-CEACAM1 y las porciones de los mismos descritos en el presente documento, mezclado con agentes de contraste de ultrasonido, tales como microburbujas, puede inyectarse local o sistémicamente en un sujeto que necesita tratamiento para el cáncer, y el ultrasonido puede acoplarse e incluso enfocarse en el área definida, por ejemplo, el lugar del tumor, para lograr la administración dirigida de los anticuerpos recombinantes anti-CEACAM1 y

porciones de los mismos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los métodos utilizan métodos de ultrasonido focalizados para lograr la administración dirigida de los anticuerpos anti-CEACAM1 y sus fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, HIFU o "ultrasonido enfocado de alta intensidad" se refiere a un método terapéutico no invasivo que usa ultrasonido de alta intensidad para calentar y destruir tejido maligno o patógeno sin causar daño al tejido saludable suprayacente o circundante. Tal como se describe en Paulsen et al., 49 J. Nucl. Med. 295 (2008) y el documento WO 2010127369, HIFU también se puede utilizar como un medio de suministro de agentes terapéuticos, tal como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos.

Los métodos que utilizan ultrasonido con contraste (CEUS) también se contemplan para su uso con agentes inhibidores anti-CEACAM1 descritos en el presente documento. El ultrasonido con contraste mejorado (CEUS) se refiere a la aplicación de medio de contraste de ultrasonido y agentes de contraste de ultrasonido a la ecografía médica tradicional. Los agentes de contraste de ultrasonido se refieren a agentes que dependen de las diferentes formas en que las ondas de sonido se reflejan desde las superficies de contacto entre las sustancias.

Varios agentes de contraste de microburbujas está disponible para su uso con las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Las microburbujas pueden diferir en su composición de concha, composición del núcleo de gas, y si están dirigidos o no. Los ligandos de direccionamiento que se unen a receptores característicos de trastornos angiogénicos, tal como CEACAM1, se puede conjugar con microburbujas, permitiendo que el complejo de microburbujas se acumule selectivamente en áreas de interés, tales como tejidos enfermos o anómalos. Esta forma de obtención de imágenes moleculares, conocida como ultrasonido dirigido con contraste mejorado, solo generará una fuerte señal de ultrasonido si las microburbujas específicas se unen en el área de interés. El ultrasonido dirigido con contraste mejorado tiene muchas aplicaciones tanto en diagnóstico médico como en agentes terapéuticos médicos.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, un anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o fragmento de anticuerpo del mismo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o una porción del mismo, que comprende una o más regiones CDR de cadena pesada que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14 o la SEQ ID NO:15; un anticuerpo anti-CEACAM1 o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una o más regiones CDR de cadena ligera que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20 o la SEQ ID NO:21; un anticuerpo anti-CEACAM1 o un fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (V_H) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO:28 o la SEQ ID NO:30; y/o un anticuerpo anti-CEACAM1 o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable (V_L) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 32, se administra a un sujeto que necesita tratamiento para un cáncer o un tumor, tales como el cáncer de páncreas, utilizando un suministro de ultrasonido dirigido. En algunas de dichas realizaciones, el suministro dirigido de ultrasonido comprende el uso de microburbujas como agentes de contraste para los cuales un anticuerpo anti-CEACAM1 o un fragmento de anticuerpo del mismo. En algunas de dichas realizaciones, el ultrasonido dirigido es HIFU.

Formulaciones farmacéuticas

Para el uso clínico de los métodos descritos en el presente documento, la administración de los antagonistas de CEACAM1, tales como los anticuerpos anti-CEACAM1 recombinantes o porciones de los mismos descritos en el presente documento, puede incluir la formulación en composiciones farmacéuticas o formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, intravenosa; mucosal, por ejemplo, intranasal; ocular u otro modo de administración. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CEACAM1 o fragmentos de anticuerpos de los mismos descritos en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier compuesto vehículo farmacéuticamente aceptable, material o composición que resulta en un tratamiento eficaz en el sujeto. Por consiguiente, una formulación farmacéutica para su uso en los métodos descritos en el presente documento puede contener un anticuerpo anti-CEACAM1 o un fragmento de anticuerpo del mismo como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, material, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente, medios, material de encapsulación, adyuvante de fabricación (p.ej., lubricante, talco magnesio, estearato de calcio o zinc, o ácido estérico), o material encapsulante solvente, involucrado en el mantenimiento de la estabilidad, solubilidad, o actividad de, un anticuerpo anti-CEACAM1 o fragmento del mismo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes

de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Los términos "excipiente", "vehículo", "vehículo farmacéuticamente aceptable", o similares, se usan indistintamente en el presente documento.

Los anticuerpos recombinantes anti-CEACAM 1 o las porciones de los mismos descritos en el presente documento pueden formularse especialmente para la administración del compuesto a un sujeto en forma sólida, líquida o de gel, incluyendo aquellas adaptadas para las siguientes: (1) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural en forma de, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; (2) aplicación tópica, por ejemplo, en forma de una crema, ungüento o un parche o aerosol de liberación controlada aplicado a la piel; (3) intravaginalmente o intrarrectalmente, por ejemplo, como pesario, crema o espuma; (4) ocularmente; (5) transdérmicamente; (6) transmucosalmente; o (79) nasalmente. Además, un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo puede implantarse en un paciente o inyectarse usando un sistema de administración de fármacos. Véase, por ejemplo, Urquhart et al., 24 Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 199 (1984); CONTROLLED RELEASE OF PESTICIDES & PHARMACEUTICALS (Lewis, ed., Plenum Press, Nueva York, 1981); las Patente de los Estados Unidos N.º 3.773.919, N.º 3.270.960.

Las formulaciones terapéuticas de los agentes antagonistas específicos de CEACAM1, tales como anticuerpos anti-CEACAM1 recombinantes o porciones de los mismos, descritos en el presente documento pueden prepararse para el almacenamiento mezclando un antagonista específico de CEACAM1 que tiene el grado deseado de pureza con vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizadores (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, ed., 1980) en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Opcionalmente, las formulaciones que comprenden las composiciones descritas en el presente documento contienen una sal farmacéuticamente aceptable, normalmente, por ejemplo, cloruro de sodio, y preferiblemente a aproximadamente concentraciones fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración de conservante varía del 0,1 al 2,0 %, normalmente en v/v. Los conservantes adecuados incluyen los conocidos en las técnicas farmacéuticas. Alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno son ejemplos de conservantes. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración del 0,005 al 0,02 %.

Las formulaciones terapéuticas de las composiciones que comprenden antagonistas específicos de CEACAM1, tales como anticuerpos recombinantes anti-CEACAM 1 y porciones de los mismos, descritos en el presente documento, también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Como alternativa, además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o un inhibidor de la angiogénesis tal como un antagonista de VEGFR. Dichas moléculas están presentes de manera conveniente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

Los ingredientes activos de las formulaciones terapéuticas de las composiciones que comprenden antagonistas específicos de CEACAM1 descritos en el presente documento también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences (16a edición, Osol, ed., 1980).

En algunas realizaciones, se pueden usar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista específico de CEACAM1, tal como un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido

glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización según el mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio tio-disulfuro, se puede lograr la estabilización modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz de polímeros específicas.

Las formulaciones terapéuticas que se utilizarán para la administración *in vivo*, como la administración parenteral, en los métodos descritos en el presente documento puede ser estéril, que se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Dosis y duración

Los antagonistas específicos de CEACAM1 descritos en el presente documento, tales como anticuerpos recombinantes anti-CEACAM1 y fragmentos de anticuerpos de los mismos, se formulan, dosifican y administran de un modo coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el sujeto particular que se está tratando, el estado clínico del sujeto individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del antagonista específico de CEACAM1 a administrar se registrará por tales consideraciones y se refiere a la cantidad mínima necesaria para mejorar, tratar o estabilizar, el cáncer; para aumentar el tiempo hasta la progresión (duración de la supervivencia libre de progresión) o para tratar o prevenir la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor latente o una micrometástasis. El antagonista específico de CEACAM 1 se formula opcionalmente con uno o más agentes terapéuticos adicionales actualmente utilizados para prevenir o tratar el cáncer o el riesgo de desarrollar un cáncer. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de antagonista específico de CEACAM1 presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores descritos anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosis y con las vías de administración que se usan en el presente documento antes o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosis empleadas hasta ahora.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de un antagonista específico de CEACAM1 es una dosificación candidata inicial para la administración a un sujeto, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Las dosis típicas incluyen, por ejemplo, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta, por ejemplo, que el cáncer es tratado, tal como se ha medido mediante los métodos descritos anteriormente o conocidos en la materia. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En un ejemplo no limitante, si el antagonista específico de CEACAM1 es un anticuerpo anti-CEACAM 1 o un fragmento de anticuerpo del mismo, el anticuerpo anti-CEACAM 1 o su fragmento de anticuerpo se administra una vez por semana, cada dos semanas, o cada tres semanas, en un rango de dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluidos pero sin limitación, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg. El progreso del uso de los métodos descritos en el presente documento puede controlarse fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

La duración de una terapia usando los métodos descritos en el presente documento continuará durante el tiempo que esté médicamente indicado o hasta que se logre un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, los descritos en el presente documento). En determinadas realizaciones, la terapia antagonista específica de CEACAM1, tal como un anticuerpo recombinante específico de CEACAM1 o una porción del mismo, descritos en el presente documento, es continua durante 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 10 años, 20 años, o por un periodo de años hasta la vida del sujeto.

Terapias de combinación

Los métodos proporcionados en el presente documento para inhibir o tratar el cáncer en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una cantidad inhibidora de la angiogénesis de un inhibidor anti-CEACAM1, tal como un anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o una porción del mismo, puede, en algunas realizaciones, comprender además la administración de uno o más tratamientos adicionales tales como inhibidores angiogénicos, quimioterapia, radiación, cirugía u otros tratamientos conocidos por los expertos en la técnica para inhibir la angiogénesis.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden además la administración de una combinación de al menos un antagonista específico de CEACAM1, tal anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo, con una o más terapias adicionales contra el cáncer. Los ejemplos de terapias adicionales contra el cáncer incluyen, sin limitación, cirugía, terapia con radiación (radioterapia), bioterapia, inmunoterapia,

quimioterapia, o una combinación de estas terapias. Además, agentes citotóxicos, se pueden usar agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos y antiproliferativos en combinación con el antagonista específico de CEACAM1.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos y usos, la presente divulgación proporciona el tratamiento del cáncer mediante la administración de cantidades eficaces de un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante y uno o más agentes quimioterapéuticos a un sujeto susceptible a o diagnosticado con, cáncer localmente recurrente o no tratado previamente. Se puede usar varios agentes quimioterapéuticos en los métodos y usos de tratamiento combinado. En "Definiciones" se proporciona una lista a modo de ejemplo y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados para su uso en los métodos descritos en el presente documento, o descritos en el presente documento.

En aquellas realizaciones relacionadas con el cáncer de páncreas, los métodos pueden comprender además uno o más tratamientos terapéuticos adicionales utilizados en tratamientos y terapias contra el cáncer de páncreas. En algunas de dichas realizaciones, el tratamiento terapéutico es cirugía o extirpación pancreática. En algunas realizaciones, la extirpación pancreática se realiza antes o antes de la administración de las cantidades eficaces de un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la extirpación pancreática se realiza después de la administración de las cantidades eficaces de un anticuerpo anti-CEACAM 1 recombinante. En algunas realizaciones, la extirpación pancreática se realiza simultáneamente con la administración de las cantidades eficaces de un anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante. En algunas realizaciones, la extirpación pancreática implica la extirpación y reconstrucción de la vena mesentérica portal o superior. En algunas realizaciones, se utiliza la extirpación por laparoscopia. En algunas de dichas realizaciones, el tatuaje endoscópico se puede utilizar para localizar pequeñas lesiones antes de la extirpación por laparoscopia. Las complicaciones postoperatorias después de la extirpación pueden incluir fugas anastomóticas pancreáticas y vaciamiento gástrico retardado.

En aquellas realizaciones relacionadas con el cáncer de páncreas, los métodos pueden comprender además la evaluación patológica del cáncer de páncreas antes de, durante y/o después de la administración del anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante. Como saben los expertos en la materia, la evaluación patológica de un tumor pancreático, tal como un tumor pancreático extirpado, proporciona información pronóstica importante. La evaluación patológica incluye la clasificación de variantes histológicas del adenocarcinoma ductal pancreático. Dichas variantes incluyen carcinomas coloides (asociados con neoplasias mucinosas papilares intraductales de tipo intestinal), cánceres medulares (que pueden tener inestabilidad de microsátélites) y otros, incluidos tumores adenoscamosos, carcinoma hepatoide, cáncer de células en anillo de sello, carcinoma indiferenciado y carcinoma indiferenciado con células gigantes similares a osteoclastos. En algunas de dichas realizaciones, también se puede realizar una evaluación molecular de los marcadores de cáncer de páncreas conocidos, tales como mediante la realización del inmunomarcaje SMAD4, que se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar metástasis generalizadas y un mal resultado después de la extirpación quirúrgica; la expresión de SPARC en fibroblastos, que se ha asociado con resultados adversos.

En algunas realizaciones relacionadas con métodos para tratar o inhibir el cáncer de páncreas, los uno o más tratamientos terapéuticos adicionales pueden comprender terapia adyuvante. Dichas terapias adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, gemcitabina; quimiorradiación; quimiorradiación basada en fluorouracilo; gemcitabina con fluorouracilo antes y después de la quimiorradiación basada en fluorouracilo; combinación de interferón alfa-2b, cisplatino y fluorouracilo de infusión continua simultáneamente con radiación de haz externo; erlotinib; combinación de gemcitabina, docetaxel y capecitabina; combinación de fluorouracilo, ácido folínico, irinotecán y oxaliplatino; combinación de gemcitabina y el inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), erlotinib; vacuna secretora de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos para el cáncer de páncreas, con o sin ciclofosfamida como agente reductor de la regulación T; y/o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones relacionadas con métodos para tratar o inhibir el cáncer de páncreas, los uno o más tratamientos terapéuticos adicionales implican la radioterapia. En el tratamiento del cáncer de páncreas, la radioterapia fraccionada se administra normalmente como 45-60 Gy durante aproximadamente 6 semanas (18-20 Gy/día), con fluorouracilo o capecitabina, una fluoropirimidina oral, como radiosensibilizador. En la configuración adyuvante, 45 Gy se administra inicialmente al lecho tumoral, a la anastomosis quirúrgica y a ganglios linfáticos regionales. Posteriormente, se puede dirigir radiación adicional (aproximadamente 5-15 Gy) al lecho tumoral para alcanzar la extensión microscópica. Las CT preoperatorias (con contraste oral e intravenoso) y los clips quirúrgicos se pueden usar para calcular el volumen óptimo y la localización de la radiación.

En algunas realizaciones de los métodos para tratar o inhibir el cáncer de páncreas, los uno o más tratamientos terapéuticos adicionales comprenden un inhibidor de PARP, tal como olaparib. Se ha demostrado que las células cancerosas pancreáticas con defectos en la vía de reparación del ADN BRCA2-PALB2-Fanconi son sensibles a los inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP).

En algunas realizaciones de los métodos para tratar o inhibir el cáncer de páncreas, los uno o más tratamientos terapéuticos adicionales comprenden un inhibidor de la vía hedgehog. Por ejemplo, el inhibidor de la vía hedgehog GDC- 0449 (Genentech, San Francisco, CA, EE.UU.), que está bajo investigación en un ensayo clínico de fase 2, en combinación con gemcitabina y la formulación de nanopartículas de paclitaxel, en pacientes con adenocarcinoma pancreático metastásico. Otros agentes terapéuticos que pueden usarse en los métodos para tratar o inhibir el cáncer

de páncreas descritos en el presente documento incluyen el inhibidor multicinasas, sorafenib y agentes dirigidos a SRC (dasatinib), y secretasa, MTOR, TNFSF10 (también conocido como TRAIL) e IGF1.

En algunas realizaciones de estos métodos, los tratamientos endoscópicos se pueden usar para suministrar o administrar el antagonista específico de CEACAM1 y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo, pero sin limitación, la administración endoscópica de quimioterapia, crioterapia, terapia fotodinámica y/o ablación por radiofrecuencia.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de un antagonista específico de CEACAM1 con uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, una mezcla) o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es, por ejemplo, capecitabina, taxano, antraciclina, paclitaxel, docetaxel, partículas unidas a la proteína paclitaxel (por ejemplo, Abraxane™), doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida o terapia de combinaciones de las mismas. Tal como se usa en el presente documento, la administración combinada incluye la administración simultánea, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que, preferentemente, hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen sus actividades biológicas de forma simultánea. Puede usarse la preparación y programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determine de forma empírica por el experto en la materia. Las pautas de preparación y dosificación para quimioterapia también se describen en Perry, CHEMOTHERAPY SERVICE ED. (Williams y Wilkins, Baltimore, Md., 1992). Por consiguiente, en algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del antagonista específico de CEACAM1 o puede administrarse simultáneamente con el mismo.

En algunas otras realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia tumoral combinada con los antagonistas de CEACAM1, tales como anticuerpos recombinantes, de la invención incluyen antagonistas de otros factores que están implicados en el crecimiento tumoral, tal como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2), ErbB3, ErbB4 o TNF. En algunas realizaciones, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al sujeto. En algunas realizaciones, el antagonista de CEACAM1 se administra conjuntamente con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar primero, seguido por el antagonista de CEACAM1. También se contempla la administración simultánea o la administración del antagonista de CEACAM1 primero. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las que se usan actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el antagonista de CEACAM1.

Los ejemplos de inhibidores angiogénicos que pueden usarse en combinación con los inhibidores de CEACAM1, tales como anticuerpos recombinantes anti-CEACAM1 y porciones de los mismos, descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación: inhibidores directos de la angiogénesis, Angiostatina, Bevacizumab (AVASTIN®), Arresten, Canstatina, Combretastatina, Endostatina, NM-3, Trombospondina, Tumstatina, 2-metoxiestradiol, cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (Vectibix™), trastuzumab (HERCEPTIN®) y Vitaxina; e inhibidores indirectos de la angiogénesis: ZD1839 (Iressa), ZD6474, OSI774 (TARCEVA), CI1033, PKI1666, IMC225 (Erbix), PTK787, SU6668, SU11248, Herceptina e IFN- α , CELEBREX® (Celecoxib), THALOMID® (Talidomida) e IFN- α . En algunas realizaciones, los inhibidores de angiogénesis para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña (TKI) de múltiples receptores de factor de crecimiento proangiogénico. Los tres TKI que actualmente están aprobados como terapias contra el cáncer son erlotinib (TARCEVA®), sorafenib (NEXAVAR®) y sunitinib (SUTENT®).

En algunas realizaciones, los inhibidores de angiogénesis para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de mTOR (diana de rapamicina en mamíferos) tal como temsirolimus (TORICEL™), bortezomib (VELCADE®), talidomida (THALOMID®) y doxiciclina.

En otras realizaciones, los inhibidores de la angiogénesis para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen factores antiangiogénicos tales como alfa-2 antiplasmina (fragmento), angiostatina (fragmento de plasminógeno), antitrombina antiangiogénica III, inhibidor derivado de cartílago (CDI), fragmento de complemento CD59, endostatina (fragmento de colágeno XVIII), fragmento de fibronectina, gro-beta (una quimiocina C-X-C), heparinasas heparina fragmento de hexasacárido, gonadotropina coriónica humana (hCG), interferón alfa/beta/gamma, proteína inducible por interferón (IP-10), interleucina-12, kringle 5 (fragmento de plasminógeno), beta-tromboglobulina, EGF (fragmento), inhibidor de VEGF, endostatina, fibronectina (fragmento de 45 kD), quinínogeno de alto peso molecular (dominio 5), fragmentos NK1, NK2, NK3 de HGF, PF-4, inhibidor de serpin, proteinasa 8, TGF-beta -1, trombospondina-1, prosaposina, p53, angioarrestina, inhibidores de la metaloproteínasa (TIMP), 2-metoxiestradiol, inhibidor de la ribonucleasa placentaria, inhibidor del activador del plasminógeno, fragmento de 16 kDa de prolactina, proteína relacionada con la proliferina (PRP), retinoides, factor de crecimiento transformante beta tetrahidrocortisol-S (TGF-beta), vasculostatina y vasoestatina (fragmento de calreticulina), pamidronato de talidomida, TNP470, la familia de los bifosfonatos, como el ácido bifosfonato de amino-zoledrónico. Antagonistas de la bombesina/péptido liberador de gastrina (GRP) como RC-3095 y RC-3940-II (Bajo et al., 90 British J. Cancer 245 (2004), péptido anti-VEGF RRRRR (dRK6) (SEQ ID NO: 40) (Yoo, 174 J. Immunol. 5846 (2005).

Por consiguiente, en relación con la administración de un inhibidor de CEACAM1, tales como anticuerpos recombinantes anti-CEACAM1 y porciones de los mismos, un compuesto que inhibe la angiogénesis indica que la administración de una manera clínicamente apropiada resulta en un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de pacientes, tal como la mejora de los síntomas, una cura, una reducción en la carga de enfermedad, la reducción en la masa tumoral o en el número de células, la extensión de la vida, la mejora en la calidad de vida u otro efecto generalmente reconocido como positivo por médicos familiarizados con el tratamiento del tipo particular de enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer de páncreas.

El antagonista específico de CEACAM1 y uno o más agentes terapéuticos pueden administrarse simultánea o secuencialmente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o eliminar la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor latente o una micrometástasis. El antagonista específico de CEACAM1 y uno o más agentes terapéuticos pueden administrarse como terapia de mantenimiento para prevenir o reducir la probabilidad de recurrencia del tumor.

Como apreciarán los expertos en la técnica, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerígenos generalmente estarán alrededor de las que ya se emplean en terapias clínicas, por ejemplo, cuando los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. La variación en la dosis probablemente ocurrirá dependiendo de la afección que se esté tratando. El médico que administra el tratamiento podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el sujeto puede ser sometido a radioterapia.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos, usos y composiciones descritos en el presente documento, el anticuerpo de CEACAM1 recombinante administrado es un anticuerpo desnudo intacto. En algunas realizaciones, el anticuerpo recombinante CEACAM1 puede conjugarse con un agente citotóxico. En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos y usos, el anticuerpo CEACAM1 conjugado y/o la porción del anticuerpo CEACAM1 del mismo es/son internalizados por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada del conjugado en la destrucción de la célula cancerosa con la que se une. En algunas realizaciones, el agente citotóxico conjugado con el anticuerpo recombinante CEACAM1 y/o la porción de anticuerpo CEACAM1 del mismo se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, calicamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas, y se describen adicionalmente en otra parte del presente documento.

Las realizaciones de los diversos aspectos descritos en el presente documento pueden ilustrarse mediante los siguientes párrafos numerados: Sin embargo, la invención debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones.

1. Un anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende: al menos un componente de la cadena ligera y al menos un componente de la cadena pesada, en donde dicho componente de la cadena pesada comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO:28 o la SEQ ID NO:30; y dicho componente de la cadena ligera comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 32, y en donde dicho anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se une al antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 5F4, 34B1 o 26H7.

2. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo del párrafo 1, en donde el anticuerpo monoclonal recombinante anti-CEACAM1 específico es un anticuerpo humanizado o una porción del mismo.

3. Un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo recombinante como se describe en el párrafo 1 unido a las regiones constantes de inmunoglobulina gamma-1 y kappa humana, respectivamente.

4. Un anticuerpo recombinante aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que comprende: una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada 1 que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y una CDR3 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, de modo que dicho anticuerpo recombinante aislado o parte de unión a antígeno del mismo se una al antígeno reconocido por 5F4.

5. Un anticuerpo recombinante aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que comprende: una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada 1 que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 13; una CDR2 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 14; una CDR3 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 15; una CDR1 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO:19; una CDR2 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:17 o la SEQ ID NO:20; y una CDR3 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 21; de manera que dicho anticuerpo recombinante aislado o parte de unión a antígeno del mismo se una al antígeno reconocido por 5F4, 34B1 o 26H7.

6. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo de cualquiera de los párrafos 4 o 5, en donde la porción de anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fd', un fragmento Fv, un fragmento de dAb, un fragmento de F(ab')₂, un fragmento de cadena sencilla, un diacuerpo o un anticuerpo lineal.

7. Un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo de cualquiera de los párrafos anteriores.

8. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de los párrafos anteriores y un vehículo.

9. El anticuerpo de una cualquiera de los párrafos anteriores, en donde dicho anticuerpo está unido a un marcador.

10. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo de cualquiera de los párrafos anteriores, que comprende además un agente conjugado con el anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o una porción del mismo para formar un inmunconjugado específico para CEACAM1.

11. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo del párrafo 10, en donde el agente conjugado con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo es un agente quimioterapéutico, una toxina, un isótopo radiactivo, una molécula pequeña, un ARNip, una nanopartícula o una microburbuja.

12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo que se une específicamente a CEACAM1 de cualquiera de los párrafos anteriores, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Un método para tratar el cáncer de páncreas, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica del párrafo 12.

14. Un método para inhibir la invasividad de las células tumorales en un sujeto que tiene un cáncer o un tumor, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica del párrafo 12.

15. El método de uno cualquiera de los párrafos 13 o 14, en donde el método comprende además la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, agentes citotóxicos o agentes antiproliferativos.

16. Un método para inhibir el crecimiento tumoral y reducir el tamaño del tumor o la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesita inhibiendo la expresión y/o función de CEACAM1 en una célula, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica del párrafo 12.

17. Un método para inhibir la progresión del cáncer al inhibir la expresión y/o función de CEACAM1 en una célula tumoral, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica del párrafo 12.

18. Un método para combinar imágenes moleculares dirigidas a CEACAM1 y la administración dirigida a CEACAM1 de un agente terapéutico, comprendiendo el método administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente terapéutico y la composición farmacéutica del párrafo 12 conjugada con un resto de direccionamiento, y determinar la presencia o ausencia de la composición farmacéutica del párrafo 12 conjugada con el resto de direccionamiento utilizando imágenes moleculares.

19. El método del párrafo 18, en donde el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, una molécula pequeña, un péptido o un aptámero.

20. Una composición farmacéutica del párrafo 12 para su uso en la inhibición de la invasividad de las células tumorales en un sujeto que tiene cáncer de páncreas o un tumor de páncreas.

21. La composición farmacéutica del párrafo 20, que comprende además uno o más agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, agentes citotóxicos o agentes antiproliferativos.

22. La composición farmacéutica del párrafo 21, en donde el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, una molécula pequeña, un péptido o un aptámero.

23. Una composición farmacéutica del párrafo 12 para su uso en la inhibición del crecimiento tumoral y la reducción del tamaño del tumor o la metástasis tumoral al inhibir la expresión y/o la función de CEACAM1 en una célula en un sujeto que lo necesite.

24. Una composición farmacéutica del párrafo 12 para su uso en la inhibición de la progresión del cáncer al inhibir la expresión y/o la función de CEACAM1 en una célula tumoral en un sujeto que lo necesite.

25. Un oligonucleótido aislado que comprende nucleótidos de la secuencia de la SEQ ID NO: 33, en donde dicho oligonucleótido codifica las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo 5F4.

26. Un oligonucleótido aislado que comprende nucleótidos de la secuencia de la SEQ ID NO: 34, en donde dicho oligonucleótido codifica las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo 5F4.

27. Un vector de expresión aislado que comprende un oligonucleótido de uno cualquiera de los párrafos 25 o 26.

28. Una célula hospedadora aislada o población de células hospedadoras aisladas que comprende el vector de expresión del párrafo 27.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Tratamiento y prevención del cáncer de páncreas por el anticuerpo 5F4

La **FIG. 1** demuestra que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano de ratón 5F4 protege a los ratones deficientes en Rag2 de la micrometástasis de la línea celular pancreática humana (AsPc-1). Se muestra la detección temprana de células tumorales AsPc1 con un método de fotosensibilización no invasivo después de la inyección intravenosa. La línea de células cancerosas de páncreas humano, AsPc-1 ($0,5 \times 10^6$ células), se administró mediante inyección en la vena de la cola. Después de 14 días, los animales recibieron una dosis oral de ácido delta-aminolevulínico (ALA; 100 mg/kg) 4-6 horas antes del sacrificio por eutanasia y análisis de fluorescencia tisular. Después, los animales se mantuvieron en condiciones de luz tenue para evitar el blanqueo fotográfico y las reacciones fototóxicas. Las cavidades abdominal y torácica de los animales se examinaron inmediatamente bajo luz blanca y luego se iluminaron con luz UV (405 nm) para evaluar la presencia de tumores en el parénquima de los pulmones y los ganglios linfáticos como evidencia de metástasis. Obsérvese el pulmón hemorrágico en el control tratado con MOPC (arriba) pero normal, pulmón de aspecto no hemorrágico en el animal tratado con 5F4 (parte inferior), indicativo de lesión parenquimatosa debido a la presencia de células tumorales. El diagrama esquemático del metabolismo de ALA se muestra a la derecha.

Las **FIGS. 2A-2B** demuestran que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano de ratón 5F4 protege a los ratones deficientes en Rag2 de la micrometástasis de la línea celular pancreática humana (AsPc-1). Examen de pulmones 14 días después de la inoculación intravenosa de la línea celular AsPc1 como en la FIG. 1. La **FIG. 2A** demuestra la capacidad de retención de agua. Los pulmones son lóbulos esponjosos dentro del pecho. La retención de agua es uno de los métodos de rutina para demostrar el daño pulmonar (por ejemplo, inflamación, edema, congestión). Para medir la retención de agua, se extirpó uno de los cinco lóbulos de animales tratados con MOPC y 5F4, se pesó y se mantuvo en un gabinete de desecación de vidrio durante 14-18 días. Después de la desecación, los pulmones se volvieron a pesar y la diferencia se muestra como porcentaje de pérdida de agua. Apenas hay pérdida de agua de los pulmones en los ratones tratados con 5F4, pero pérdida considerable de agua en los ratones tratados con MOPC-1. La **FIG. 2B** muestra el pulmón colapsado en animales tratados con MOPC (15 ml cónico, derecha). Los pulmones poseen bolsas de aire. Los pulmones dañados a menudo tienen pérdida de aire y elasticidad. El aire dentro de un pulmón normal produce una mayor flotabilidad. Para medir el daño pulmonar por flotabilidad, cuatro de los cinco lóbulos del anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano de ratón 5F4 (en este caso, N.º 216, izquierda) y animales tratados con MOPC (en este caso, N.º 208, derecha) los animales tratados fueron extirpados, se enjuagaron con agua destilada y se hizo flotar en tampón PBS durante no menos de 2 horas. Los pulmones sanos flotan (tratados con anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano de ratón 5F4) y los pulmones colapsados (tratamiento con anticuerpos MOPC) se hunden.

La **FIG. 3** representa un modelo de metástasis *in vivo* utilizado en los experimentos descritos en el presente documento. La línea de células cancerosas de páncreas humano, AsPc-1, se estableció como xenoinjertos mediante inyección subcutánea en los flancos de ratones *Rag2*^{-/-}. Anticuerpo monoclonal anti-CEACAM 1 humano, 5F4 (200 µg/ratón) o IgG1 de ratón (MOPC, 200 µg) se administró por vía intraperitoneal 1 día antes, 2 días y 4 días y posteriormente cada 3 días después de la inoculación de las células tumorales durante los tiempos indicados. Los ratones se sacrificaron a las 6 semanas después de la inoculación subcutánea para evaluar la metástasis tumoral y los volúmenes en el sitio de inoculación. Los volúmenes tumorales se calcularon como $\% \pi * (L/2) * (H/2) * (W/2)$ en donde W representa el ancho, H representa la altura y L representa la longitud.

Las **FIGS. 4A-4D** demuestran que el anticuerpo 5F4 descrito en el presente documento previene la metástasis de AsPc-1 a los ganglios linfáticos axilares después de la inoculación subcutánea tal como se describe en la FIG. 3. Los datos aquí muestran un análisis dos semanas después de la inoculación subcutánea. El análisis de FACS reveló la presencia de células CEACAM 1 + humanas en los GL axilares de ratones tratados con MOPC pero no en ratones tratados con 5F4 ya que el anticuerpo monoclonal 5F4 es específico para CEACAM1 humano pero no reconoce CEACAM1 de ratón (n=3 por grupo) (Figuras 4A y 4C). El análisis por PCR reveló niveles detectables de CEACAM1-L humano en los GL axilares de ratones tratados con MOPC pero no en ratones tratados con 5F4 (n= 2 por grupo) (Figuras 4B y 4D). Bz, bazo. GL, ganglio linfático axilar. GLM, ganglios linfáticos mesentéricos.

Las **FIGS. 5A-5E** muestran que el anticuerpo 5F4 descrito en el presente documento previene la metástasis de AsPc-1 en la cavidad abdominal 14 días después de la inoculación subcutánea. Se observaron células de nódulos tumorales derivadas de AsPc-1 para estudiar el peritoneo en ratones *Rag2*^{-/-} tratados con MOPC (ratones 4/7; FIG. 5B) pero no en los tratados con 5F4 (ratones 0/7; FIG. 5A). La tinción con hematoxilina y eosina de los nódulos reveló la presencia de células AsPc-1 en ratones tratados con MOPC (25x, FIG. 5C y 100x, FIG. 5D). La cuantificación de estos resultados se muestra en la FIG. 5E.

Las **FIGS. 6A-6O** demuestran que el anticuerpo 5F4 descrito en el presente documento previene la metástasis de AsPc-1 en ratones *Rag2*^{-/-}. A los ratones *Rag2*^{-/-} se les administraron células AsPc-1 por vía subcutánea, como en la FIG. 3. Se administraron MOPC (IgG1 de ratón) o 5F4 por vía intraperitoneal en la pauta descrita en la FIG. 3 y en ratones evaluados a las 6 semanas después de la inoculación. Los tumores visibles de AsPc-1 se localizaron en el sitio de inyección. El tumor localizado en el sitio de inyección se observó después del día 9 de la inoculación del tumor en ratones tratados con 5F4 (FIGS. 6A, 6C y 6E; flecha). El tumor en la inoculación de los animales tratados con MOPC se observó más tarde a los 28 días después de la inoculación y fue más grande (FIGS. 6B, 6D y 6F; las flechas indican tumor en el sitio de inoculación y metástasis peritoneales). La diseminación intraperitoneal solo se observó en ratones que recibieron MOPC (FIGS. 6D, 6F, 6L y 6O; las flechas indican metástasis asociadas con órganos tales como el páncreas (FIGS. 6L y 6O) y el estómago (FIG. 6O); las flechas indican metástasis al peritoneo en las FIGS.

6D, 6L y 6O). Se observaron vasos sanguíneos dentro del tumor en el sitio de inoculación en ratones tratados con MOPC (FIG. 6H) pero no en ratones tratados con 5F4 (FIG. 6G). Se observó tumor en la próstata (FIG. 6J) y el páncreas (FIGS. 6L y 6O) de ratones tratados con MOPC pero no en la próstata (FIG. 6I) o el páncreas (FIG. 6K) de ratones tratados con 5F4. Se observaron tumores en la pared del estómago (FIG. 6O, flecha superior) adyacente al tumor pancreático (FIG. 6O, flecha inferior). Se detectaron células tumorales en los GL mediastínicos (FIG. 6M, flecha) y pulmones (FIG. 6M, flecha) de ratones tratados con MOPC. La FIG. 6N muestra una vista de la cavidad abdominal 6 semanas después de la inoculación subcutánea de células AsPc1 tratadas 5 semanas con el anticuerpo monoclonal 5F4. No se observan metástasis.

La **FIG. 7** representa tumores subcutáneos macroscópicos representativos después de la inoculación subcutánea a las 6 semanas después de la inoculación. Los paneles superiores muestran tumores subcutáneos extirpados de los flancos de animales tratados con 5F4 y MOPC-1 en las pautas de tratamiento indicadas. Los paneles inferiores muestran secciones transversales horizontales de los mismos tumores de los animales experimentales indicados. Los paneles inferiores muestran una mayor necrosis de tumores en los ratones tratados con 5F4. Se muestran los volúmenes tumorales y se calcularon como $\% \pi * (E/2) * (H/2) * (W/2)$ donde W representa el ancho, H representa la altura y L representa la longitud y se muestra debajo de los tumores en mm³.

La **FIG. 8** muestra la patología de tumores subcutáneos en animales inoculados por vía subcutánea con AsPc-1 después de 6 semanas. Los tumores subcutáneos se componen de láminas y nidos de carcinoma mal diferenciados con características epitelioides y algunas vacuolas de mucina intracelular compatibles con adenocarcinoma. Muestran algunos cambios degenerativos y necrosis central que aumenta después de un tratamiento prolongado con 5F4, anticuerpo monoclonal específico de CEACAM1 humano.

La **FIG. 9** demuestra que el anticuerpo monoclonal anti-CEACAM1 humano 5F4 protege a los ratones deficientes en Rag2 de la macrometástasis de la línea celular pancreática humana (AsPc-1) 6 semanas después de la inoculación subcutánea de células AsPc-1 en ratones *Rag2*^{-/-}. Los tumores metastásicos macroscópicos representativos después de la inoculación subcutánea solo se observan en animales tratados con MOPC. Cuatro y cinco semanas de tratamiento con anticuerpo monoclonal 5F4 fueron capaces de prevenir la metástasis como se muestra. Se observaron tumores en la pared del estómago adyacente al tumor pancreático metastásico y la cavidad peritoneal con invasión a los tejidos de la mucosa en los animales tratados con MOPC (como también se describe en la FIG. 6).

La **FIG. 10** muestra la patología de metástasis de células tumorales pancreáticas de propagación a larga distancia después de la inoculación subcutánea en ratones tratados con anticuerpo MOPC a las 6 semanas después de la inoculación. La patología de los tejidos individuales se muestra después de la tinción con hematoxilina y eosina. Las estrellas (*) indican el extenso crecimiento tumoral observado en ratones *Rag2*^{-/-} inmunodeficientes solo en el control de MOPC, pero no ratones tratados con 5F4. Se observó que las células humanas de cáncer de páncreas crecían en ratones *Rag2*^{-/-} y metastatizaban en la próstata, hígado, pulmón (10x aumentos), ganglio linfático mesentérico e intestino delgado (20x aumentos). Además, la invasión linfática de las células tumorales pancreáticas en el pulmón se observó en este modelo, como lo demuestran los asteriscos dobles (20x aumentos). Este último se muestra mediante tinción de inmunofluorescencia (citoqueratina, indicativa del tumor; LYVE-1, indicativo de vasos linfáticos).

La **FIG. 11** muestra la identificación de tumores metastásicos después de la inoculación subcutánea a las 6 semanas. Se muestran pulmones de animales tratados con MOPC y 5F4. El tumor solo se identificó en los animales tratados con MOPC, pero no 5F4, la administración como se revela por tinción con un marcador tumoral (citoqueratina). DAPI tiñe los núcleos.

Las **FIGS. 12A-12B** muestran la identificación por inmunofluorescencia de metástasis linfáticas después de la inoculación subcutánea. La **FIG. 12A** muestra la tinción específica para vasos linfáticos (marcador de endotelio de vasos linfáticos, Lyve-1) y células tumorales invasivas (citoqueratina) identificadas después del tratamiento con MOPC pero no con el tratamiento con 5F4. Las células tumorales estaban rodeadas por vasos linfáticos recién generados (tinción consistente con superposición entre estos dos marcadores). La **FIG. 12B** demuestra que no se identificó ninguna tinción específica para los vasos linfáticos (marcador de endotelio de vasos linfáticos, Lyve-1) ni células tumorales (citoqueratina) después del tratamiento con 5F4.

Las **FIGS. 13A-13E** muestran la identificación por inmunofluorescencia de metástasis linfáticas después de la inoculación subcutánea. La FIG. 13A muestra el páncreas de animales tratados con 5F4. No fue identificable ninguna tinción específica para vasos linfáticos (marcador de endotelio de vasos linfáticos, Lyve-1) ni células tumorales (citoqueratina). Las FIGS. 13B-13E muestran páncreas de animales tratados con MOPC. Se identificó la tinción específica para vasos linfáticos (marcador de endotelio de vasos linfáticos, Lyve-1) y células tumorales invasivas (citoqueratina). En las FIGS. 13D y 13E, las células tumorales estaban rodeadas por vasos linfáticos recién generados.

La **FIG. 20** representa un modelo terapéutico para el tratamiento del cáncer de páncreas con el anticuerpo monoclonal 5F4. Se inocularon 2×10^6 células AsPc1 por vía subcutánea en ratones *Ceacam1*^{-/-}*Rag2*^{-/-}. A los 12 días después de la inoculación del tumor y evidencia de un tumor palpable, la terapia con el anticuerpo monoclonal 5F4 se inició a 200 microgramos por inyección cada 2-3 días para un total de 6 inyecciones durante un período de 2 semanas. Durante este tiempo, el tamaño del nódulo tumoral subcutáneo local se midió tal como se muestra. MOPC (IgG1 de ratón)

sirvió como control. Los animales tratados con MOPC, tal como se muestra con el ratón número 73 (triángulos), presentaban un crecimiento tumoral aumentado en relación con los ratones tratados con anticuerpo monoclonal 5F4 tal como se muestra con los ratones número 71 y 72 (cuadrado y círculo). Estos estudios demuestran la inhibición del crecimiento tumoral primario mediada por 5F4.

La **FIG. 21** demuestra que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo monoclonal 5F4 bloquea la enfermedad metastásica en los pulmones. Usando el protocolo descrito en la FIG. 20, se sacrificaron los ratones tratados con 5F4 y MOPC en el día 26. Se recogieron tejidos pulmonares y se tiñeron tejidos con hematoxilina y eosina después de la fijación con parafina. El examen microscópico de las secciones histológicas se examinó para determinar el número de focos tumorales demostrables en los pulmones, así como el tamaño del nódulo más grande identificado en el grupo tratado con 5F4 (n=4) y en el grupo tratado con MOPC (n=4). Como se puede observar, El tratamiento con 5F4 dio como resultado una disminución en el número y el tamaño de los nódulos metastásicos hacia los pulmones en ratones *Ceacam1^{-/-}XRag2^{-/-}*.

Ejemplo 2. Clonación y secuenciación de los anticuerpos monoclonales anti-CEACAM1

El objetivo de este ejemplo fue obtener secuencias de la región V (V_H y V_L) que codifican los anticuerpos monoclonales expresados por cada uno de los tres hibridomas (5F4/2C6/2H3, 34B1/2E8/2E6 y 26H7/2H9/2E10). Se revivieron células viables de hibridoma congelado y se extrajo ARN. El ARNm se transcribió inversamente y las transcripciones específicas de anticuerpo se amplificaron por PCR. Los productos de PCR fueron clonados, se determinaron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones de anticuerpos V_H y V_L , y se analizaron los datos de la secuencia.

Los isotipos de cada anticuerpo se determinaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular usando un kit de isotipado de mAb de ratón ELISA de Pierce Rapid (Thermo Scientific N.º de cat. 37503). Se descubrió que los tres anticuerpos eran IgG1/k de ratón. El ARN se extrajo de los sedimentos celulares usando un kit RNAQUEOUS®-4PCR (Ambion N.º de cat. AM1914). Las regiones V se amplificaron por RT-PCR usando grupos de cebadores degenerados para secuencias señal de anticuerpos murinos junto con cebadores de región constante para IgGV_H e IgkV_L. El ARNm de la región V de la cadena pesada se amplificó usando un conjunto de seis grupos de cebadores degenerados (HA a HF) y el ARNm de la región V de la cadena ligera se amplificó usando un conjunto de siete grupos de cebadores degenerados (KA a KG). Los productos de PCR obtenidos de cada una de las amplificaciones exitosas se purificaron y clonaron en un vector de clonación 'TA' (pGEM-T® Easy, Promega, n.º de cat. A1360), de donde se obtuvieron las secuencias.

Para el hibridoma 5F4/2C6/2H3, la región V de la cadena pesada, se observaron productos de amplificación del tamaño esperado con los grupos de cebadores HA, HC y HF. Para la región V de la cadena ligera, los productos de amplificación por RT-PCR se obtuvieron de los grupos de cebadores KB, KC y KG. Dieciocho clones de V_H y catorce clones de V_L fueron secuenciados. Se identificó un único gen V_H funcional en diez clones de grupos de cebadores HA y HF. Se descubrió que los clones secuenciados del grupo de cebadores HC contenían una transcripción no funcional. Se identificó una única secuencia del gen V_L funcional en los seis clones del grupo de cebadores KG. Los ocho clones V_L restantes secuenciados de los grupos de cebadores KB y KC contenían una transcripción anómala (número de acceso GenBank M35669) normalmente asociada con el compañero de fusión de hibridoma SP2/0.

Para el hibridoma 34B1/2E8/2E6, la región V de la cadena pesada, se observaron productos de amplificación del tamaño esperado con los grupos de cebadores HA, HC y HF. Para la región V de la cadena ligera, los productos de amplificación por RT-PCR se obtuvieron de los grupos de cebadores KB, KC y KG. Dieciocho clones de V_H y catorce clones de V_L fueron secuenciados. Se identificó un solo gen funcional de V_H en once clones secuenciados a partir de grupos de cebadores HA y HF. Se descubrió que los clones secuenciados del grupo de cebadores HC contenían una transcripción no funcional. Se identificó una única secuencia del gen V_L funcional en los seis clones del grupo de cebadores KG. Los 8 clones V_L restantes secuenciados de los grupos de cebadores KB y KC contenían una transcripción anómala (número de acceso GenBank M35669) normalmente asociada con el compañero de fusión de hibridoma SP2/0.

Para el hibridoma 26H7/2H9/2E10, la región V de la cadena pesada, se observaron productos de amplificación del tamaño esperado con los grupos de cebadores HA, HB, HC y HF. Para la región V de la cadena ligera, los productos de amplificación por RT-PCR se obtuvieron de los grupos de cebadores KB, KC, KD, KF y KG. Veintiocho clones V_H y veintinueve V_L fueron secuenciados. Se identificó un solo gen funcional de V_H en diez clones secuenciados de grupos de cebadores HA y HF. Se descubrió que los clones secuenciados de los grupos de cebadores HB y HC contenían una transcripción no funcional. Se identificaron dos secuencias funcionales del gen V_L , uno que se identificó en ocho clones de los grupos de cebadores KD y KG (denominado 'seq1') y otro que se identificó en dos clones de los grupos de cebadores KD y KF (denominado 'seq2'). Los ocho clones V_L secuenciados de los grupos de cebadores KB y KC contenían una transcripción anómala (número de acceso GenBank M35669) normalmente asociada con el compañero de fusión de hibridoma SP2/0.

Un análisis de las secuencias obtenidas de los hibridomas 5F4/2C6/2H3, 34B1/2E8/2E6 y 26H7/2H9/2E10 mostró que las secuencias de la región V tenían altas homologías con los subgrupos de la región V del ratón. Además, las

longitudes de CDR estaban en el intervalo normal para las regiones V de ratón. Por tanto, no se considera que los anticuerpos monoclonales de 5F4/2C6/2H3, 34B1/2E8/2E6 y 26H7/2H9/2E10 tengan características inusuales que requieran medidas inusuales para la humanización. Además, se observó que las cadenas V_H de ratón mostraron buena homología con las secuencias más cercanas de la región V de la línea germinal humana (78 %, 79 %, 75 % de identidad para 5F4/2C6/2H3, 34B1/2E8/2E6 y 26H7/2H9/2E10 respectivamente), así como las cadenas V_K para el anticuerpo 26H7/2H9/2E10 (77 % y 73 % para seq1 y seq2, respectivamente) mientras las dos cadenas V_K restantes mostraron una homología general más baja con las regiones V de la línea germinal humana (62 % y 60 % de identidad para 5F4/2C6/2H3 y 34B1/2E8/2E6, respectivamente). Esto indica que, particularmente para las cadenas V_K con baja homología de línea germinal humana, la humanización estándar de la línea germinal requiere la entrada de mutaciones en los marcos de la línea germinal con la probabilidad de crear epítopos de linfocitos T CD4⁺. Estas consideraciones respaldan aún más la aplicación de la tecnología COMPOSITE HUMAN ANTIBODY™ (que utiliza segmentos de regiones V humanas), como se describe en el presente documento, que no está influenciado por las homologías de la región V entre las regiones V de la línea germinal de ratón y humano y crea secuencias completamente humanizadas desprovistas de epítopos de linfocitos T.

Las regiones V de los hibridomas 5F4/2C6/2H3, 34B1/2E8/2E6 y 26H7/2H9/2E10 se clonaron y secuenciaron, lo que resultó en la identificación de secuencias únicas para V_H y V_K en anticuerpos de 5F4/2C6/2H3 y 34B1/2E8/2E6. Se encontraron una sola secuencia V_H y 2 V_K en el anticuerpo de 26H7/2H9/2E10; sin embargo, la frecuencia de las transcripciones sugiere que es probable que seq1 sea específica de antígeno, aunque se pueden preparar dos anticuerpos alternativos que comprenden cada secuencia V_K (típicamente como anticuerpos quiméricos) para el análisis de unión para confirmar que seq1 es la secuencia V_K auténtica para el anticuerpo de 26H7/2H9/2E10. El análisis de las secuencias no indicó características inusuales que requieran medidas inusuales para la humanización.

La secuencia de aminoácidos del hibridoma 5F4/2C6/2H3 V_H es:

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLCAASGFISSHGMSWVRQTPDKRL
EWVATISSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNNDKNTLYLQMNSLKSED
TAMYYCARHDFDYDAAWFAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:26)

La secuencia de aminoácidos del hibridoma 5F4/2C6/2H3 V_L es:

QIVLTQSPALMSASPGVKVTMTCSANSSVSVMYWRQKPRSSPKP
WIYLTSLNLAGVPARFSGSGSGTSYSLTSSMEAEADAATYYCQQW
SSNPPTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:27)

La secuencia de aminoácidos del hibridoma 34B1/2E8/2E6 V_H es:

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSFYGMSWVRQTPDKRL
EWVATFSGGGNYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSED
TARYYCARHGGLPFYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:28)

La secuencia de aminoácidos de los híbridos 34B1/2E8/2E6 V_L es:

EIVITQSPALMAASPGVKVTITCSVSSSISSNLHWYQQKSETSPKP
WIYGTFNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTSSMEAEADAATYYCQQW
SSHPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:29)

La secuencia de aminoácidos del hibridoma 26H7/2H9/2E10 V_H es:

EVQLVESGGGFVKPGGSLKLSCAASGFSFSDYYLYWVRQTPEKRL
EWVATISVGGGNTSYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMSSLKSED
TAMYYCTRGLYYGPAWFAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:30)

La secuencia de aminoácidos del hibridoma 26H7/2H9/2E10 V_L(seq1) es:

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQT
PGQSPKLLVYFASTRESGVDPDRFIGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAD
YFCQQHYSTPWTFGGGKLEIR (SEQ ID NO:31)

La secuencia de aminoácidos del hibridoma 26H7/2H9/2E10 VL(seq2) es:

5

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQKISGYLSWLQQKPDGTIKR
LIYAASTLD SGV PKR FSGSRSGSDYSLTISSEDFADYYCLQYA
SSLMYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:32)

La secuencia de oligonucleótidos que codifica el hibridoma 5F4/2C6/2H3 VH es:

GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTGAAGCCTG
GAGGGTCCCTGAAACTCGCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAATTTTC
AGTAGCCATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAG
GCTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGCAGTGGTGGTACTTACACCT
ACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATATCCAGAGAC
AATGACAAAAACACCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACACGACTTTGATT
ACGACGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC
ACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO:33)

10

La secuencia de oligonucleótidos que codifica el hibridoma 5F4/2C6/2H3 VL es:

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCACTCATGTCTGCATCTCC
AGGGGTGAAAGTCACCATGACCTGCAGTGCCAACTCAAGTGTA
AGTTACATGTATTGGTATCGGCAGAAGCCAAGATCCTCCCCCAA
ACCCTGGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTG
CTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTCACA
ATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
GCAGTGGAGTAGTAACCCACCCACGTTCTGGGCTCGGGGACAAAG
TTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:34)

15

La secuencia de oligonucleótidos que codifica el hibridoma 34B1/2E8/2E6 HV es:

ES 2 753 614 T3

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTG
GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC
AGTTTCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAG
GCTGGAGTGGGTTCGCAACCTTTAGTGGTGGTGGTAATTACACCT
ACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGAC
AATGCCAAGAACAACCTTTACCTCCAAATGAGCAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCAGGTATTACTGTGCAAGACATGGGGGGGTTA
CCATTTTATGCTATGGACTACTGGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAC
CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:35)

La secuencia de oligonucleótidos que codifica el hibridoma 34B1/2E8/2E6 LV es:

5 GAAATTGTGATCACCCAGTCTCCAGCACTCATGGCTGCATCTCC
AGGGGAGAAGGTCACCATCACCTGCAGTGTCTCCTCAAGTATAA
GTTCCAGCAACTTGCAGTGGTACCAGCAGAAGTCAGAAACCTCC
CCCAAACCTGGATTTATGGCACATTTAACCTGGCTTCTGGAGT
CCCTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTATTCTCT
CACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACT
GTCAACAGTGGAGTAGTCACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACA
AAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:36)

La secuencia de oligonucleótidos que codifica el hibridoma 26H7/2H9/2E10 VH es:

10 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGGCTTTGTGAAGCCTG
GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCTTTC
AGTGACTATTACTTGTATTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAAAG
GCTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAACACCT
CCTATCCGGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGAC
AATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGGGGCCTTTACTACG
GCCCCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACT
GTCTCTGCA (SEQ ID NO:37)

La secuencia de oligonucleótidos que codifica el hibridoma 26H7/2H9/2E10(seq1) VL es:

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGTCAGT
AGGACAGAAGGTCACCTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTT
TAAATAGTAGCAATCAAAAGAACTATTTGGCCTGGTTCCAGCAG
ACACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCAC
TAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGTTCTG
GGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAGGAC
CTGGCAGATTACTTCTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGTGGAC
GTTTCGGTGGAGGCAACCAAGCTGGAAATCAGA (SEQ ID NO:38)

La secuencia de oligonucleótidos que codifica el hibridoma 26H7/2H9/2E10(seq2) VL es:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCT
GGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCTGGGCAAGTCAGAAAATT
AGTGGTTACTTAAGCTGGCTTCAGCAGAAACCTGATGGAACTAT
TAAGCGCCTCATCTACGCCGCATCCACTTTAGATTCTGGTGTCC
CAAAAAGGTTCAAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTC
ACCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTG
TCTACAATATGCTAGTTCTCTCATGTACACGTTCTGGAGGGGGGA
CCAAACTGGAAATAAAG (SEQ ID NO:39)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.

<120> ANTICUERPOS RECOMBINANTES ANTI-CEACAM1 PARA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER

<130> 043214-071411-PCT

<140>
<141>

<150> 61/565.640
<151> 01/12/2011

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 1

Ser Ser His Gly Met Ser
1 5

$$\begin{aligned} \langle 210 \rangle & 2 \\ \langle 211 \rangle & 17 \end{aligned}$$

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 2

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

Gly

10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 3

20

His	Asp	Phe	Asp	Tyr	Asp	Ala	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr
1				5					10		

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30

<400> 4

Ser	Ala	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr
1				5				10	

35

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 5

Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5		

45

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

55

<400> 6

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr
1				5				

5 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 10 <400> 7
 Ser Phe Tyr Gly Met Ser
 1 5
 15 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 8
 Thr Phe Ser Gly Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 9
 35 His Gly Gly Leu Pro Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 40 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 45 <400> 10
 Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His
 1 5 10
 50 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 11

ES 2 753 614 T3

		Gly Thr Phe Asn Leu Ala Ser
		1 5
5	<210> 12	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
	<400> 12	
		Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Phe Thr
		1 5
15	<210> 13	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
	<400> 13	
25		Ser Asp Tyr Tyr Leu Tyr
		1 5
	<210> 14	
	<211> 17	
30	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
35	<400> 14	
		Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys
		1 5 10 15
		Gly
40	<210> 15	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
	<400> 15	
		Gly Leu Thr Thr Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
50		1 5 10
	<210> 16	
	<211> 17	
	<212> PRT	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 753 614 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 16

5 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

10 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 17

Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 18

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

35 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

45 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 20

55 Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

60 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <400> 21

Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 22

10

<400> 22
000

<210> 23

15

<400> 23
000

<210> 24

20

<400> 24
000

<210> 25

25

<400> 25
000

<210> 26

30

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 26

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

Ser Leu Lys Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser His
20 25 30

40

ES 2 753 614 T3

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

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

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

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

Ala Arg His Asp Phe Asp Tyr Asp Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 27

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 27

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

Val Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 28

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

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

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

Ala Thr Phe Ser Gly Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro 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 Lys Ser Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Gly Leu Pro Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 29

20

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp
35 40 45

ES 2 753 614 T3

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro
85 90 95

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

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 30

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

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

Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Thr Arg Gly Leu Tyr Tyr Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 753 614 T3

<400> 31

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

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Gln
35 40 45

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

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

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Arg

5

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 32

15

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

ES 2 753 614 T3

Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 33

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 33

gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga gac ttg gtg aag cct gga ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc gcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt agc cat 96
Ser Leu Lys Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser His
20 25 30

ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agc agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag ggg cga ttc acc ata tcc aga gac aat gac aaa aac acc ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga cac gac ttt gat tac gac gcg gcc tgg ttt gct tac tgg ggc 336
Ala Arg His Asp Phe Asp Tyr Asp Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 34

<211> 318

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(318)

<400> 34

caa att gtt ctc acc cag tct cca gca ctc atg tct gca tct cca ggg	48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
gtg aaa gtc acc atg acc tgc agt gcc aac tca agt gta agt tac atg	96
Val Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Tyr Met	
20 25 30	
tat tgg tat cgg cag aag cca aga tcc tcc ccc aaa ccc tgg att tat	144
Tyr Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr	
35 40 45	
ctc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt	192
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
ggg tct ggg acc tct tat tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa	240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu	
65 70 75 80	
gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg agt agt aac cca ccc acg	288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr	
85 90 95	
ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa	318
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

10

<210> 35

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<220>

20 <221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 35

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag cct gga ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt ttc tat	96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr	
20 25 30	

25

ES 2 753 614 T3

	ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag tgg gtc	144
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
	gca acc ttt agt ggt ggt ggt aat tac acc tac tat cca gac agt gtg	192
	Ala Thr Phe Ser Gly Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
	50 55 60	
	aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctt tac	240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65 70 75 80	
	ctc caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc agg tat tac tgt	288
	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	gca aga cat ggg ggg tta cca ttt tat gct atg gac tac tgg ggt caa	336
	Ala Arg His Gly Gly Leu Pro Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
	gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	360
	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
5	<210> 36 <211> 324 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
	<220> <221> CDS <222> (1)..(324)	
15	<400> 36	
	gaa att gtg atc acc cag tct cca gca ctc atg gct gca tct cca ggg	48
	Glu Ile Val Ile Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ala Ala Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
	gag aag gtc acc atc acc tgc agt gtc tcc tca agt ata agt tcc agc	96
	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser	
	20 25 30	
	aac ttg cac tgg tac cag cag aag tca gaa acc tcc ccc aaa ccc tgg	144
	Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp	
	35 40 45	
	att tat ggc aca ttt aac ctg gct tct gga gtc cct gtt cgc ttc agt	192
	Ile Tyr Gly Thr Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser	
	50 55 60	
	ggc agt gga tct ggg acc tct tat tct ctc aca atc agc agc atg gag	240
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu	
	65 70 75 80	
	gct gaa gat gct gcc act tat tac tgt caa cag tgg agt agt cac cca	288
	Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro	

ES 2 753 614 T3

	85	90	95	
	ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg gaa ata aaa			324
	Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105		
5	<210> 37 <211> 360 <212> ADN <213> Secuencia artificial			
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético			
15	<220> <221> CDS <222> (1)..(360)			
	<400> 37			
	gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg ggg ggc ttt gtg aag cct gga ggg			48
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Lys Pro Gly Gly			
	1 5 10 15			
	tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc tct ttc agt gac tat			96
	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr			
	20 25 30			
	tac ttg tat tgg gtt cgc cag act ccg gaa aaa agg ctg gag tgg gtc			144
	Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val			
	35 40 45			
	gca acc att agt gtt ggt ggt ggt aac acc tcc tat ccg gac agt gtg			192
	Ala Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val			
	50 55 60			
	aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac aac ctg tac			240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr			
	65 70 75 80			
	ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt			288
	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
	85 90 95			
	aca agg ggc ctt tac tac ggc ccg gcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa			336
	Thr Arg Gly Leu Tyr Tyr Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln			
	100 105 110			
	ggg act ctg gtc act gtc tct gca			360
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
	115 120			
20	<210> 38 <211> 339 <212> ADN <213> Secuencia artificial			
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético			
30	<220> <221> CDS <222> (1)..(339)			

ES 2 753 614 T3

<400> 38

gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg gct atg tca gta gga	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly	
1 5 10 15	
cag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agc ctt tta aat agt	96
Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser	
20 25 30	
agc aat caa aag aac tat ttg gcc tgg ttc cag cag aca cca gga cag	144
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Gln	
35 40 45	
tct cct aaa ctt ctg gta tac ttt gca tcc act agg gaa tct ggg gtc	192
Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
50 55 60	
cct gat cgc ttc ata ggc agt ggt tct ggg aca gat ttc act ctt acc	240
Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
65 70 75 80	
atc agc agt gtg aag gct gag gac ctg gca gat tac ttc tgt cag caa	288
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln	
85 90 95	
cat tat agc act ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc	336
His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
100 105 110	
aga	339
Arg	

5 <210> 39
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)..(324)

<400> 39

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc tta tct gcc tct ctg gga	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag aaa att agt ggt tac	96
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Gly Tyr	
20 25 30	

20

ES 2 753 614 T3

tta agc tgg ctt cag cag aaa cct gat gga act att aag cgc ctc atc	144
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile	
35 40 45	
tac gcc gca tcc act tta gat tct ggt gtc cca aaa agg ttc agt ggc	192
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt agg tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc agc ctt gag tct	240
Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca gac tat tac tgt cta caa tat gct agt tct ctc atg	288
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Leu Met	
85 90 95	
tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa ctg gaa ata aag	324
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

5 <210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 40

Arg Arg Lys Arg Arg Arg
 1 5

15 <210> 41
 <211> 365
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 41

gaggtgcagt tgggtggagtc tggggggagac ttggtgaagc ctggaggggc cctgaaactc	60
gcctgtgcag cctctggatt catttttcagt agccatggca tggcatgtct tgggttcgcc	120
agactccaga caagaggctg gagtgggtcg caaccattag cagtgggtgt acttacacct	180
actatccaga cagtgtgaag gggcgattca ccatatccag agacaatgac aaaaaacaccc	240
tgtacctgca aatgaacagt ctgaagtctg aggacacagc catgtattac tgtgcaagac	300
acgactttga ttacgacgcg gcctggtttg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg	360
tctct	365

30 <210> 42
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 753 614 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 42

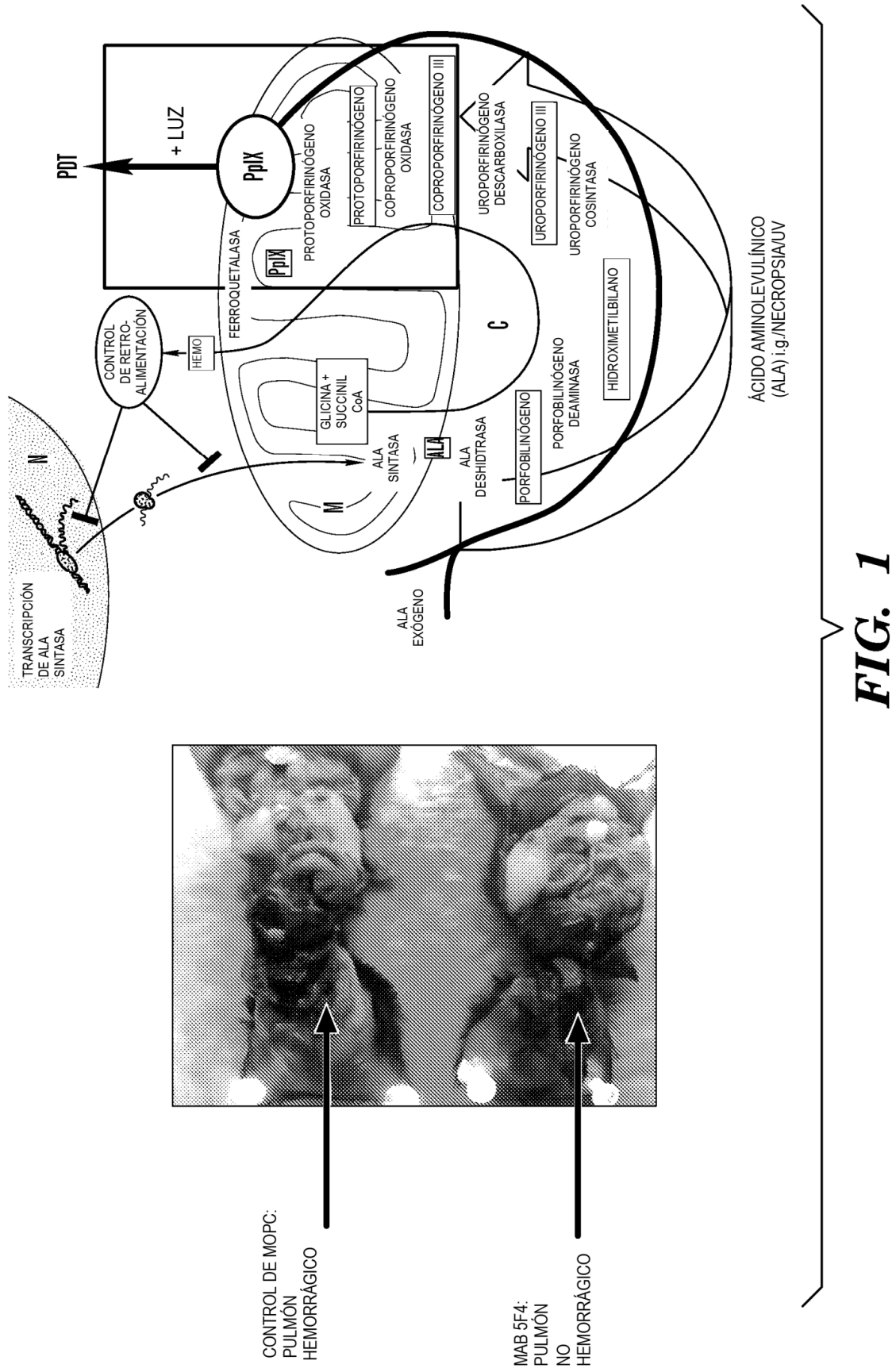
gaagtgcagc	tggaggagtc	tgaggggggc	tttgtgaagc	ctggaggggc	cctgaaactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	ctctttcagt	gactattact	tgtattgggt	tcgccagact	120
ccggaaaaaa	ggctggagtg	ggcgcgaacc	attagtgttg	gtggtggtaa	cacctcctat	180
ccggacagtg	tgaaggggcg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaagaa	caacctgtac	240
ctgcaaata	gcagtctgaa	gtctgaggac	acagccatgt	attactgtac	aaggggcctt	300
tactacggcc	cggcctgggt	tgcttactgg	ggccaaggga	ctctggtcac	tgtctct	357

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende: al menos un componente de la cadena ligera y al menos un componente de la cadena pesada, en donde dicho componente de la cadena pesada comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO:28 o la SEQ ID NO:30; y dicho componente de la cadena ligera comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:31 o la SEQ ID NO:32.
2. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal recombinante anti-CEACAM1 específico es un anticuerpo humanizado o una porción del mismo.
3. Un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo recombinante como se describe en la reivindicación 1 unido a las regiones constantes de inmunoglobulina gamma-1 y kappa humanas, respectivamente.
4. Un anticuerpo recombinante aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que comprende: una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada 1 que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una CDR3 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
5. Un anticuerpo recombinante aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que comprende: una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada 1 que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 13; una CDR2 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 14; una CDR3 de cadena pesada que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 15; una CDR1 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO:19; una CDR2 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:17 o la SEQ ID NO:20; y una CDR3 de cadena ligera que consiste en los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 21.
6. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en donde la porción de anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fd', un fragmento Fv, un fragmento de dAb, un fragmento de F(ab')₂, un fragmento de cadena sencilla, un diacuerpo o un anticuerpo lineal.
7. Un kit o una composición de diagnóstico que comprenden el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo está unido a un marcador.
9. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un agente conjugado con el anticuerpo recombinante anti-CEACAM1 o una porción del mismo para formar un inmunoconjugado específico para CEACAM1, en donde el agente conjugado con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo es opcionalmente un agente quimioterapéutico, una toxina, un isótopo radiactivo, una molécula pequeña, un ARNip, una nanopartícula o una microburbuja.
10. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método administrar el anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo a un sujeto que tiene cáncer.
11. El anticuerpo monoclonal recombinante específico de CEACAM1 aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides y cáncer de próstata.
12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CEACAM1 recombinante o una porción del mismo que se une específicamente a CEACAM1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8 o 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso en un método para combinar imágenes

- 5 moleculares dirigidas a CEACAM1 y la administración dirigida a CEACAM 1 de un agente terapéutico, comprendiendo el método administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente terapéutico y dicha composición farmacéutica conjugada con un resto de direccionamiento, y determinar la presencia o la ausencia de dicha composición farmacéutica conjugada con el resto de direccionamiento utilizando imágenes moleculares, en donde el agente terapéutico es opcionalmente un agente quimioterapéutico, una molécula pequeña, un péptido o un aptámero.
- 10 14. Una composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso en un método para tratar el cáncer de páncreas o un método para inhibir la invasividad de las células tumorales en un sujeto que tiene cáncer de páncreas o un tumor de páncreas, en donde dicha composición farmacéutica opcionalmente comprende además uno o más agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, agentes citotóxicos, agentes antiproliferativos, o una molécula pequeña, un péptido o un aptámero.
- 15 15. Una composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso en la inhibición del crecimiento tumoral y reducir el tamaño del tumor o la metástasis tumoral al inhibir la expresión y/o la función de CEACAM1 en una célula en un sujeto que lo necesite, o para su uso en la inhibición de la progresión del cáncer al inhibir la expresión y/o la función de CEACAM1 en una célula tumoral en un sujeto que lo necesite.
- 20 16. Un oligonucleótido aislado que comprende (i) nucleótidos de la secuencia de la SEQ ID NO: 33, y (ii) nucleótidos de la secuencia de la SEQ ID NO: 34, o
un conjunto de oligonucleótidos que comprende un oligonucleótido que comprende (i) y un oligonucleótido que comprende (ii), o un vector de expresión aislado o un conjunto de vectores de expresión que comprende el oligonucleótido de (i) y (ii).
- 25 17. Una célula hospedadora aislada o una población de células hospedadoras aisladas que comprenden el vector de expresión de la reivindicación 16.



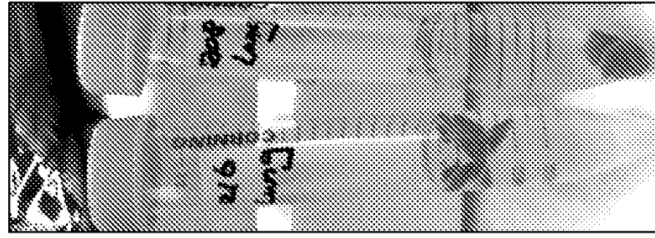


FIG. 2B

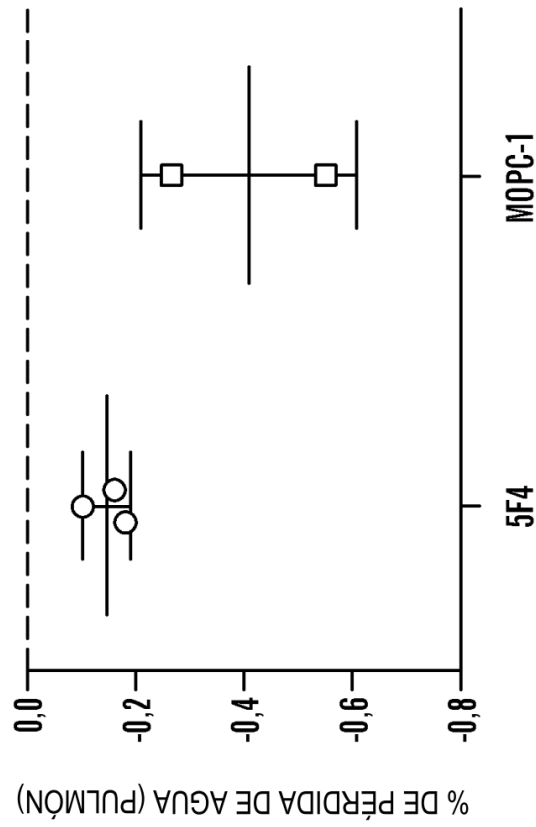


FIG. 2A

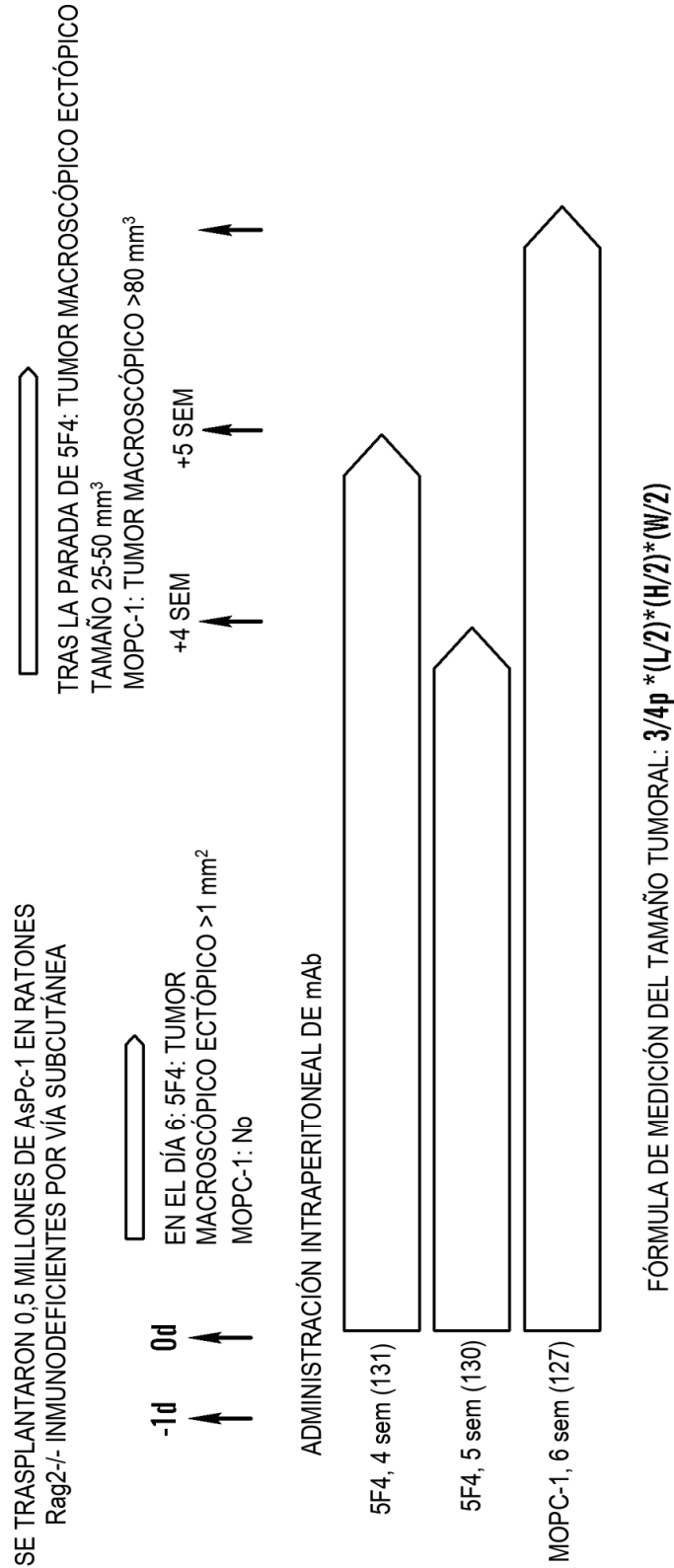


FIG. 3

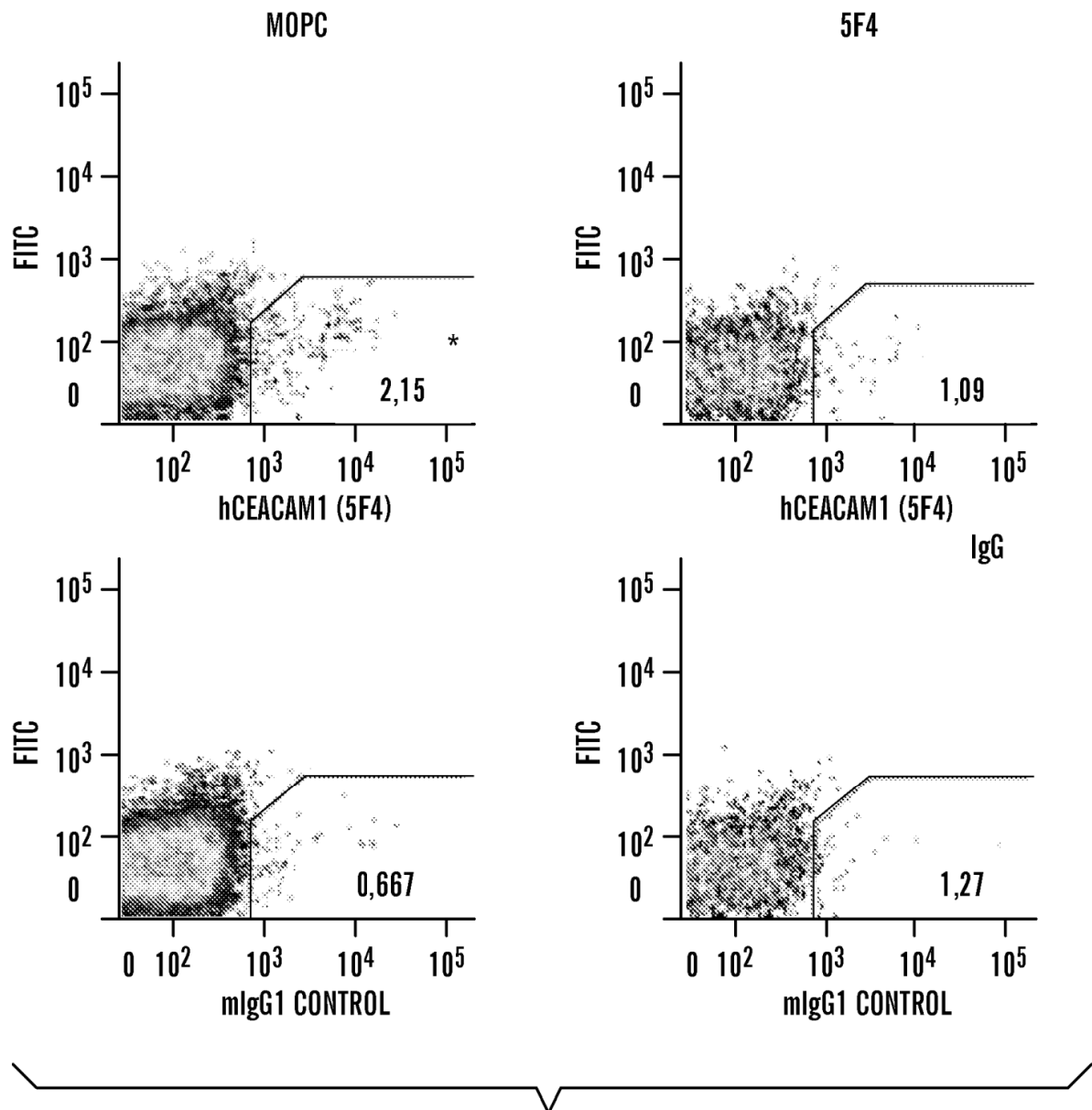


FIG. 4A

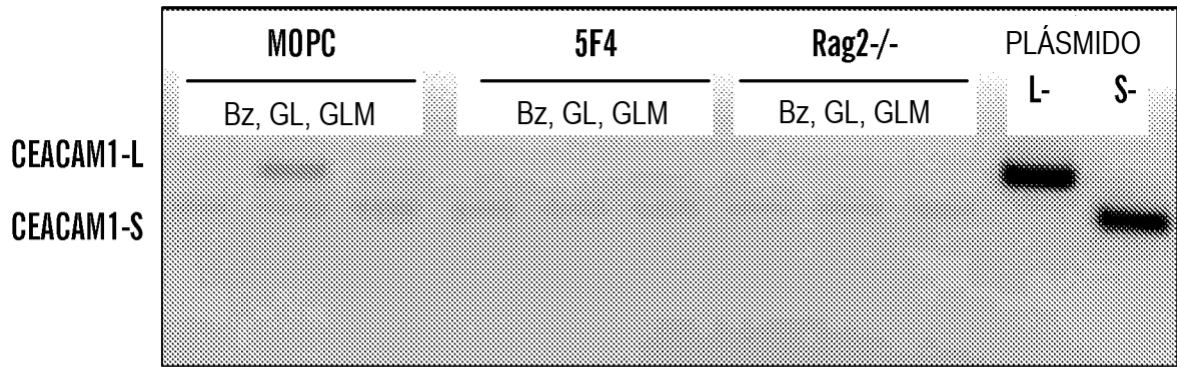


FIG. 4B

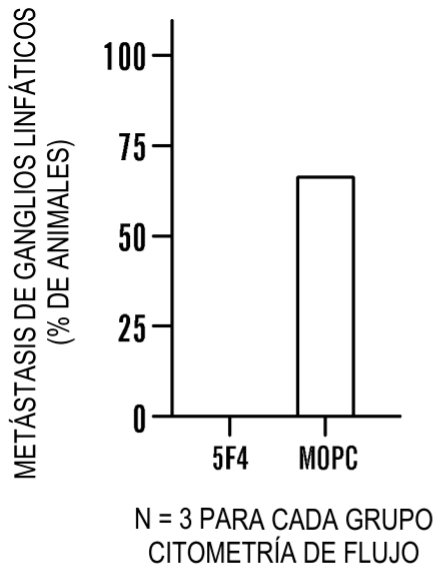


FIG. 4C

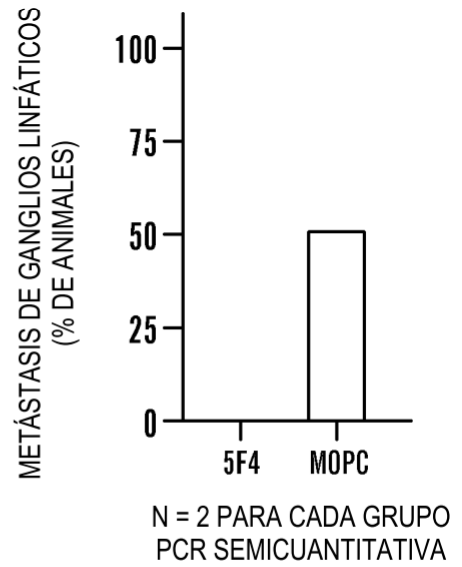


FIG. 4D

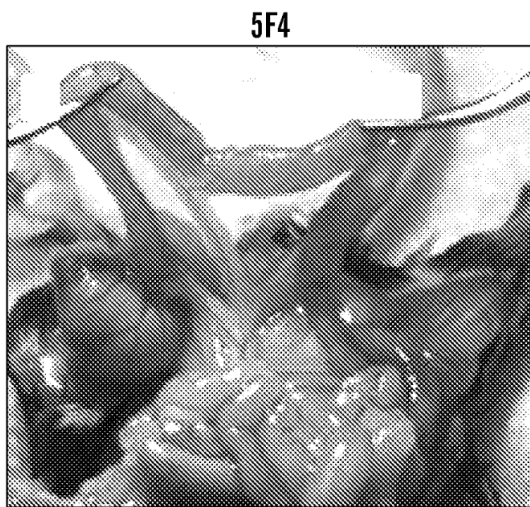


FIG. 5A

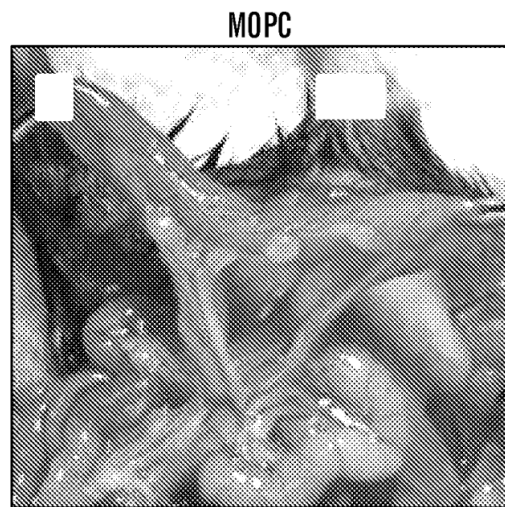


FIG. 5B

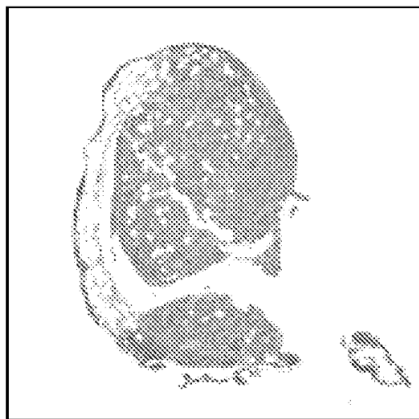


FIG. 5C

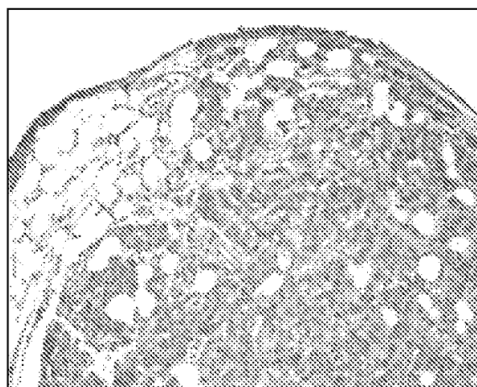


FIG. 5D

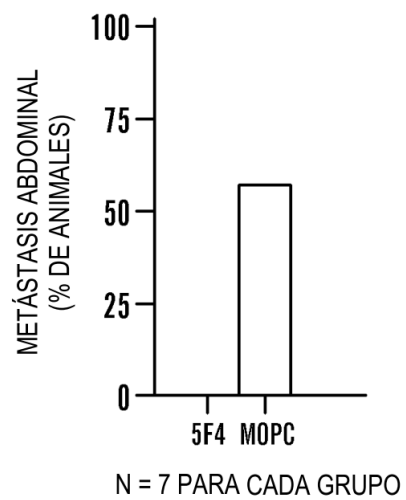


FIG. 5E

5F4



FIG. 6A

MOPC



FIG. 6B

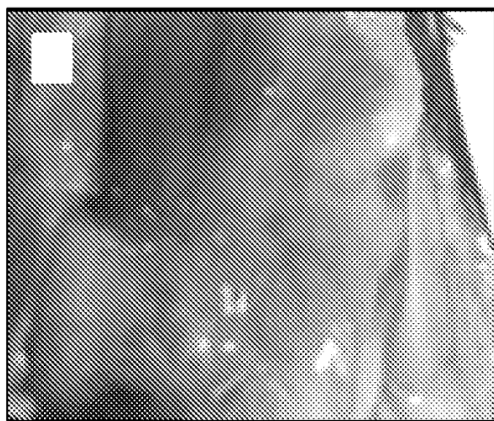


FIG. 6C

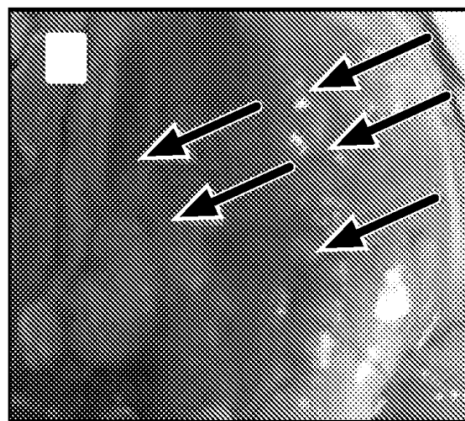


FIG. 6D

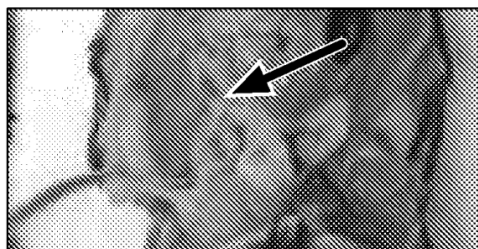


FIG. 6E

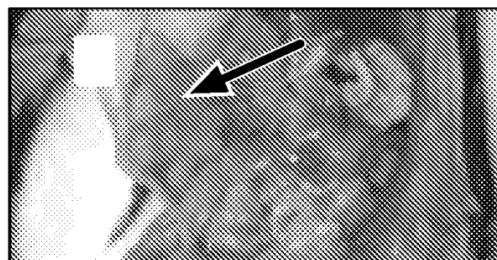


FIG. 6F



FIG. 6G

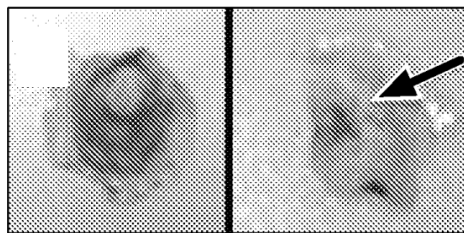


FIG. 6H

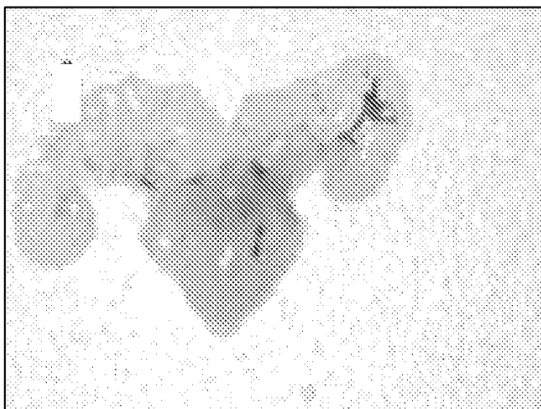


FIG. 6I

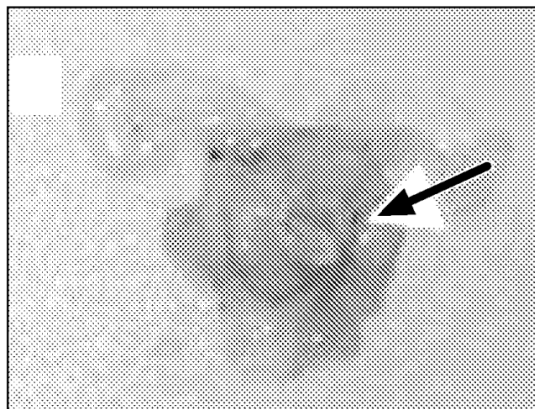


FIG. 6J

5F4

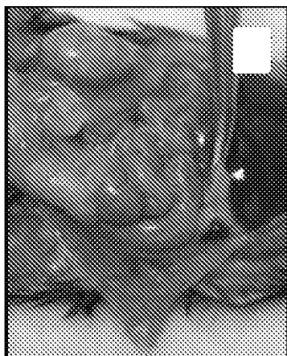


FIG. 6K

MOPC

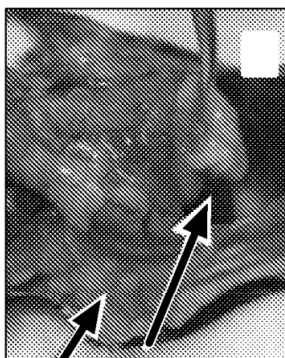


FIG. 6L

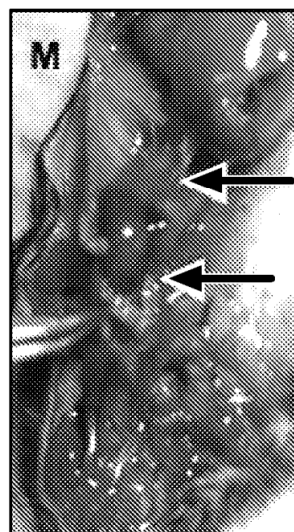


FIG. 6M

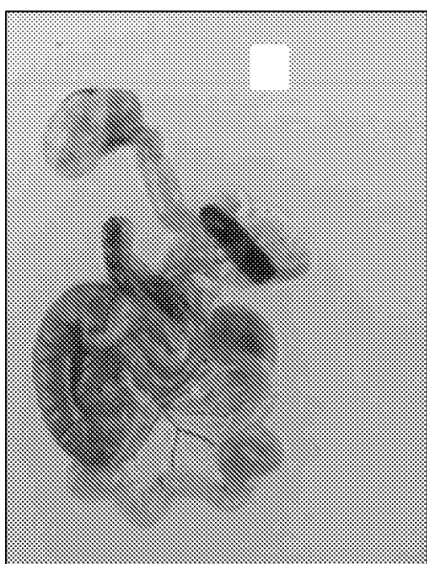


FIG. 6N

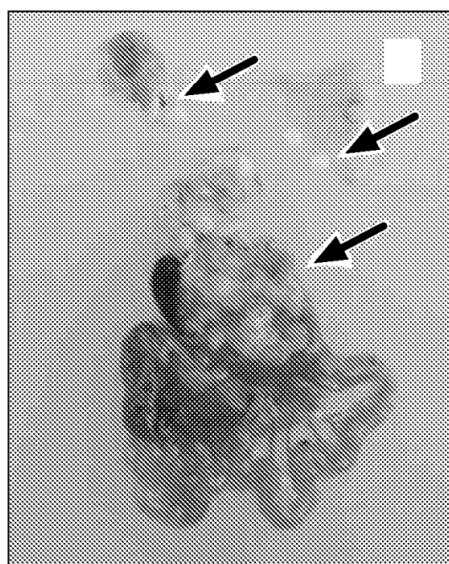
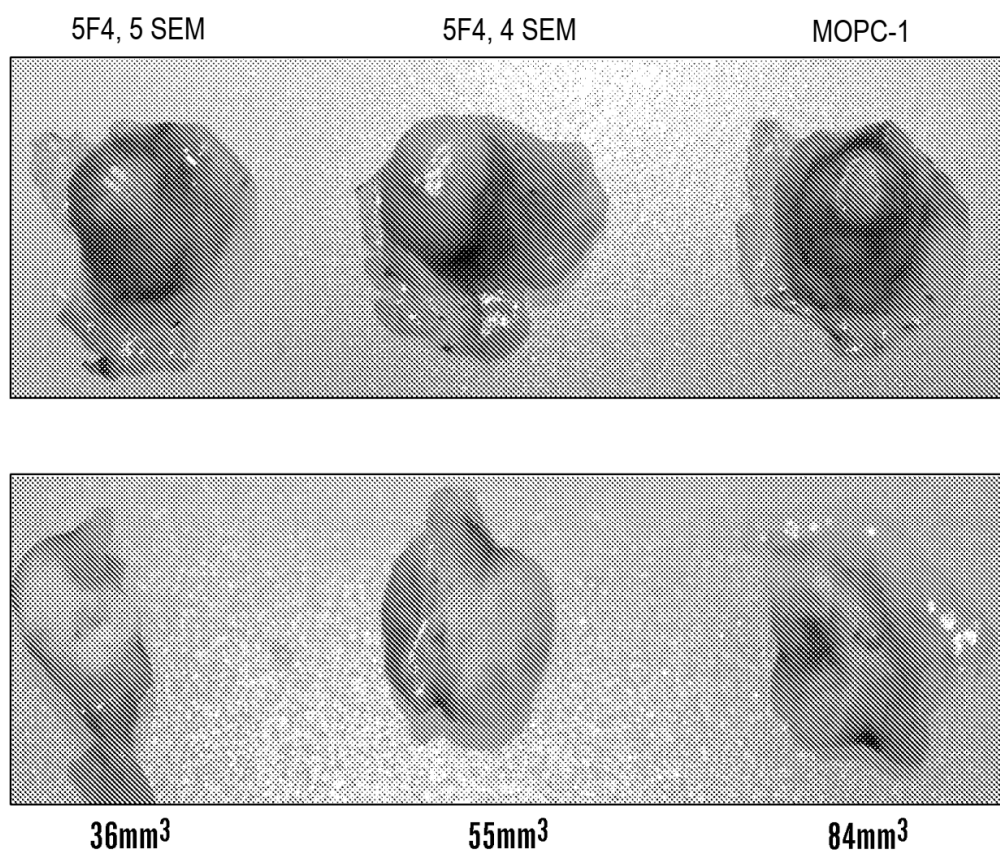


FIG. 6O



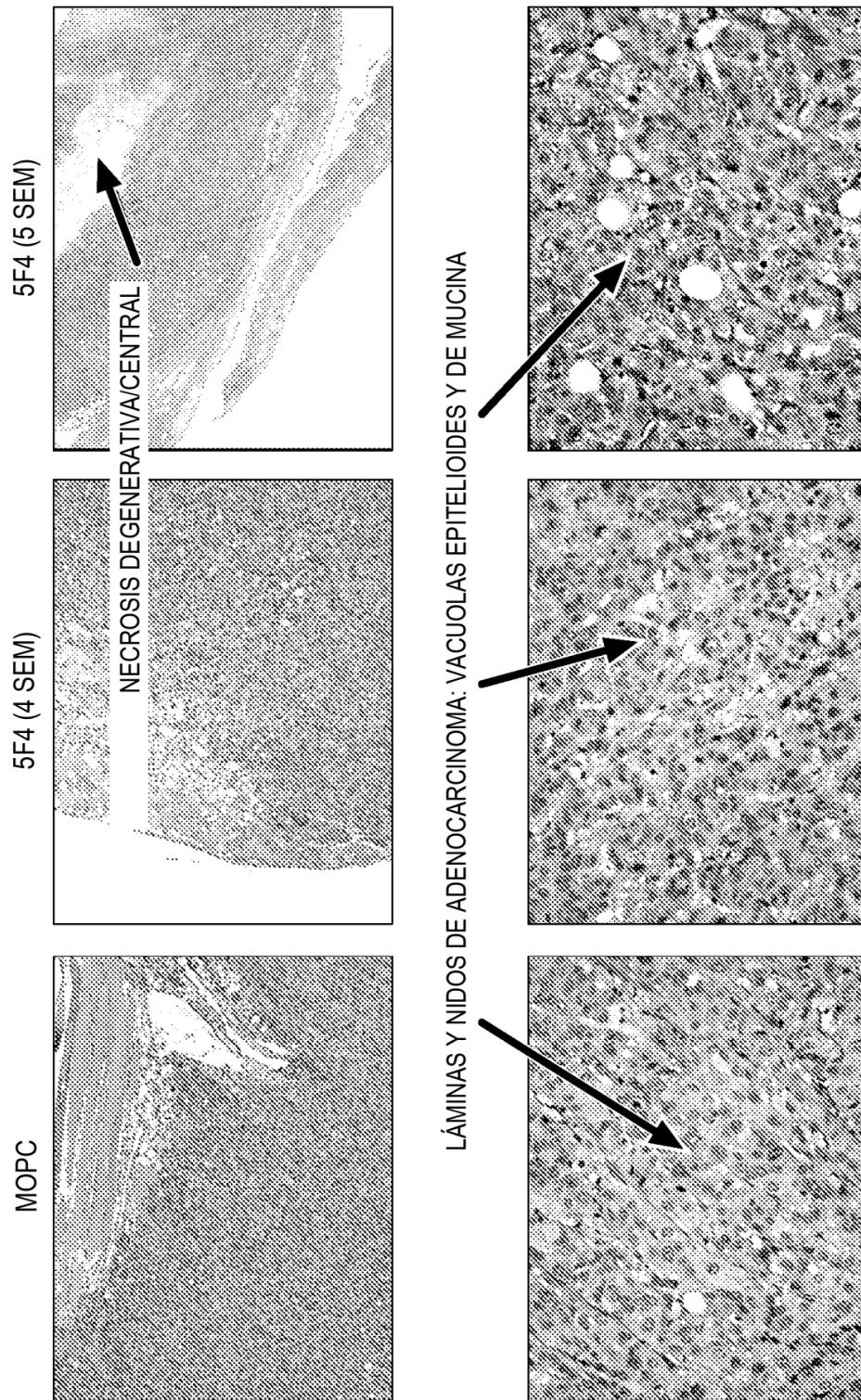


FIG. 8

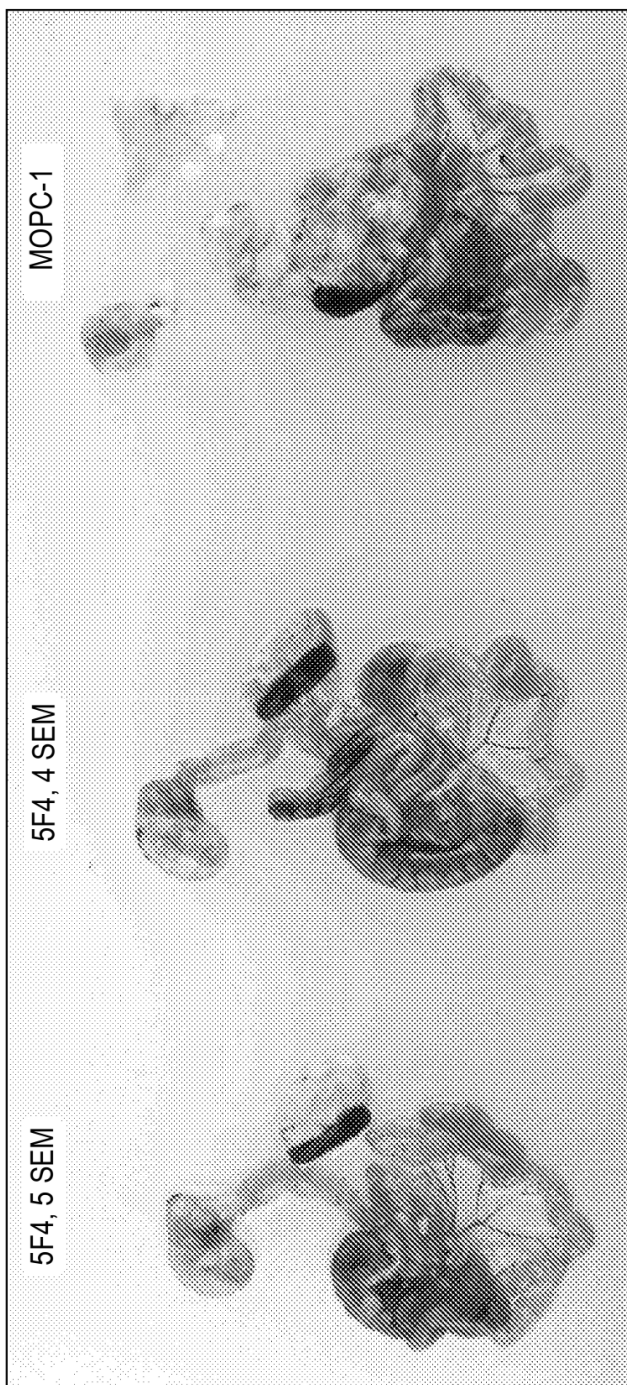


FIG. 9

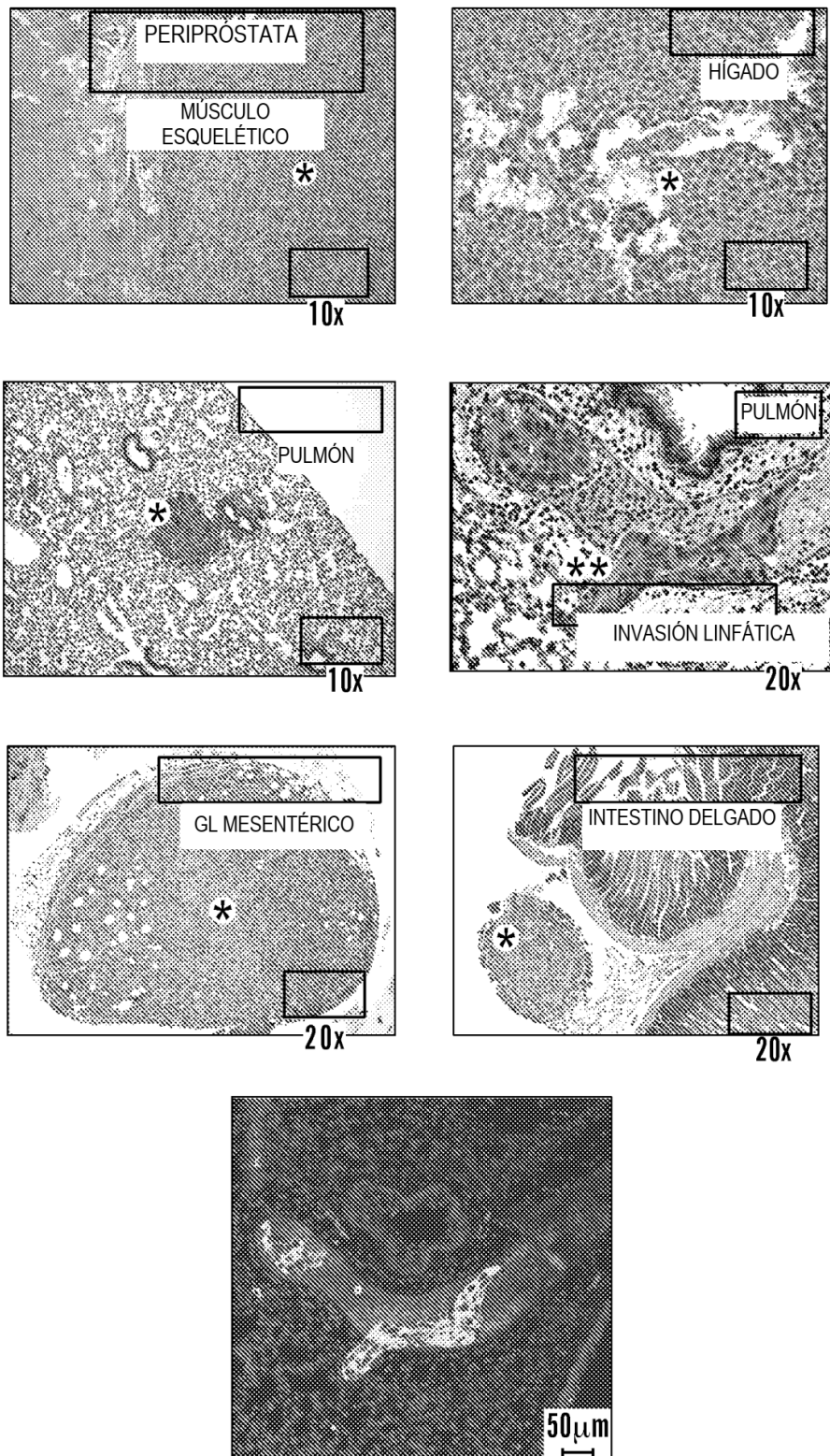


FIG. 10

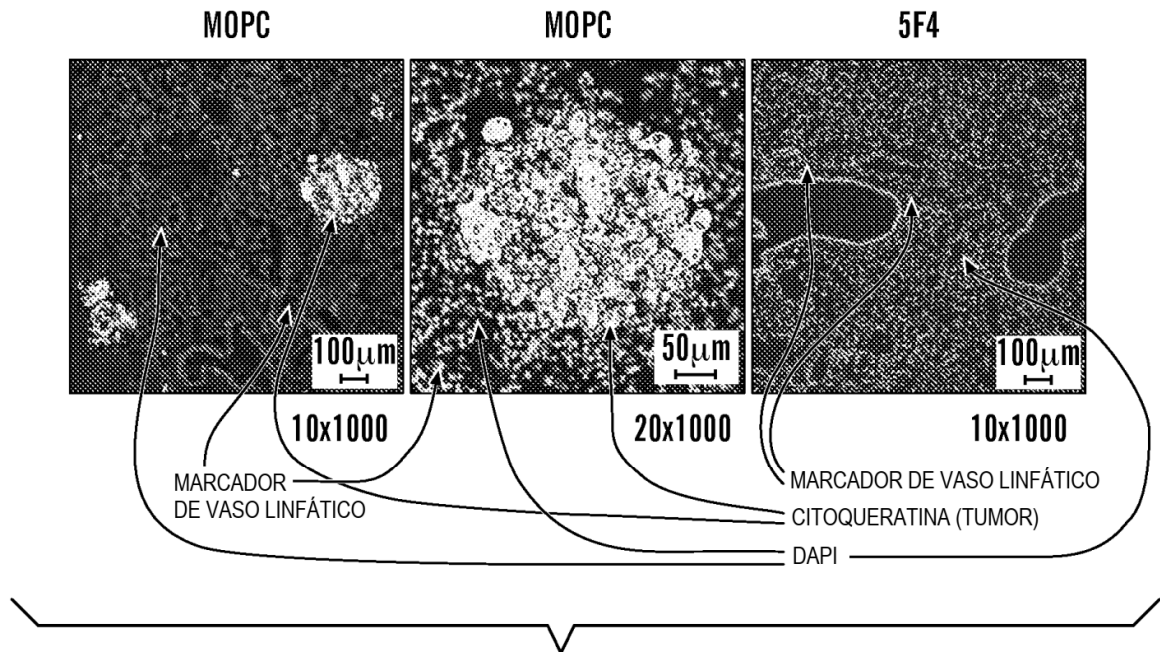


FIG. 11

AsPc-1 (6 SEMANAS)

MOPC

AsPc-1 (6 SEMANAS)

5F4

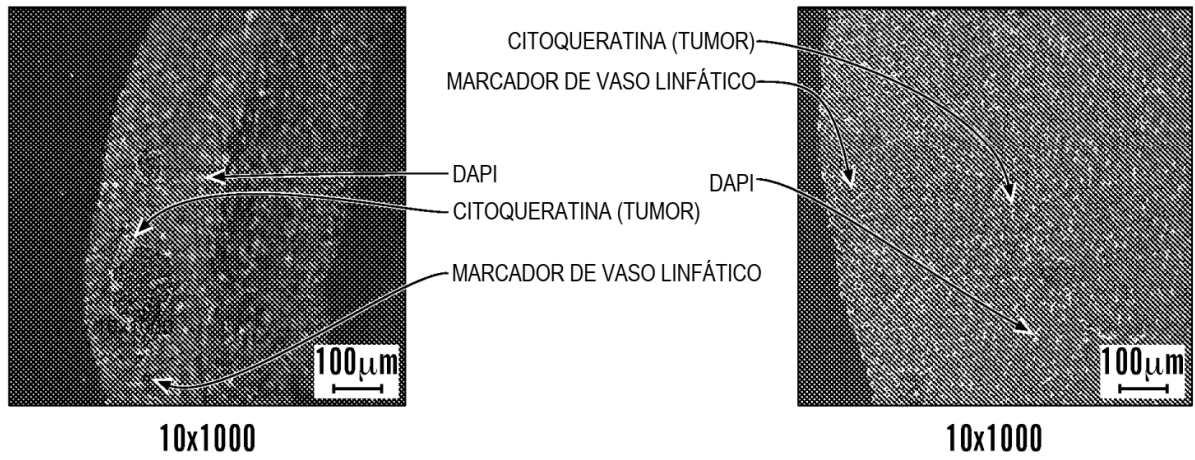


FIG. 12A

FIG. 12B

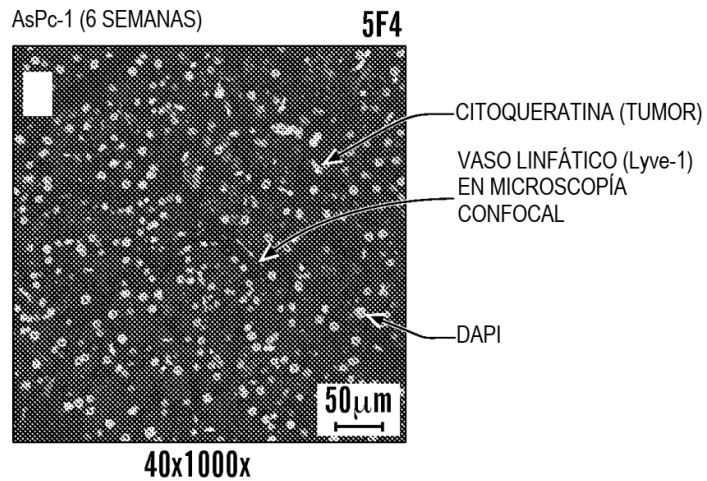


FIG. 13A

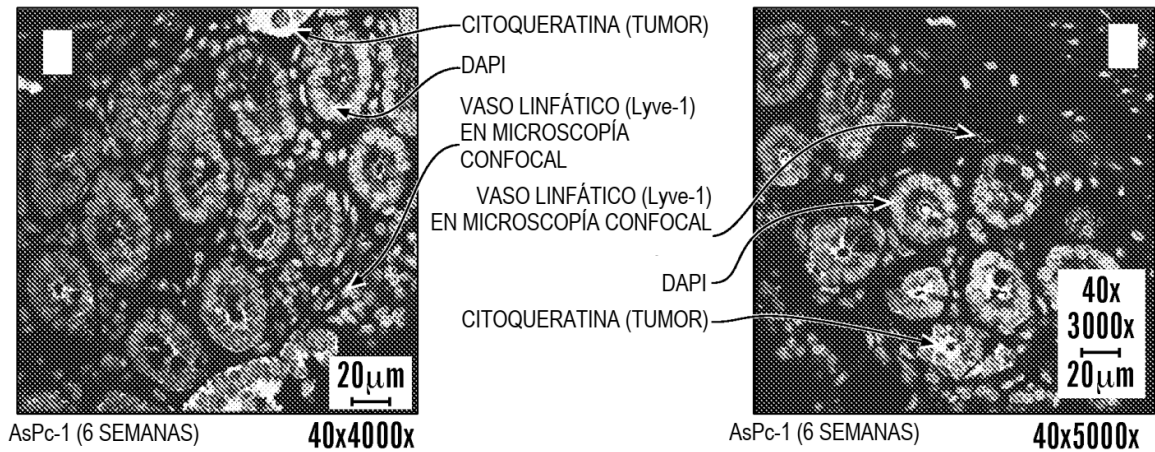


FIG. 13B

FIG. 13C

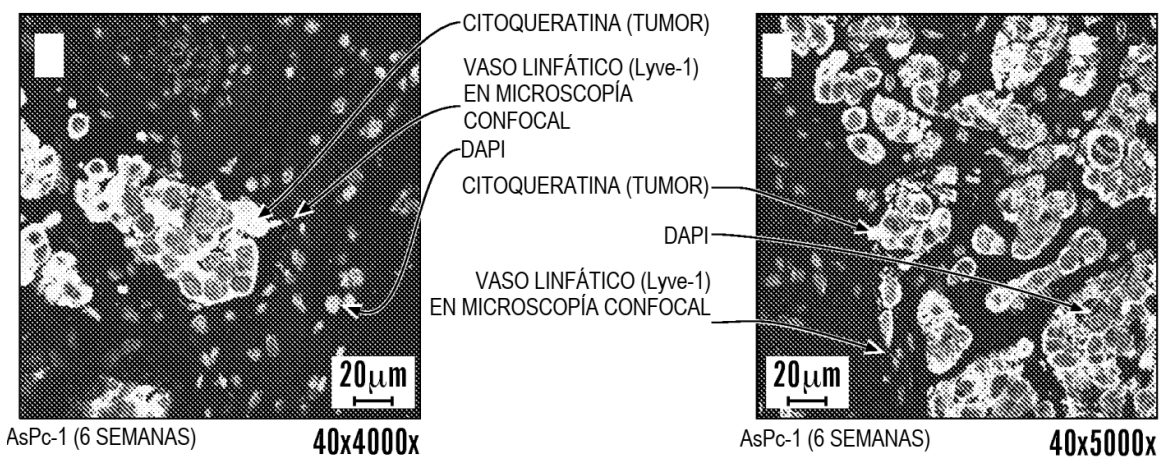


FIG. 13D

FIG. 13E

Secuencias de cadena pesada de hibridoma 5F4/2C6/2H3

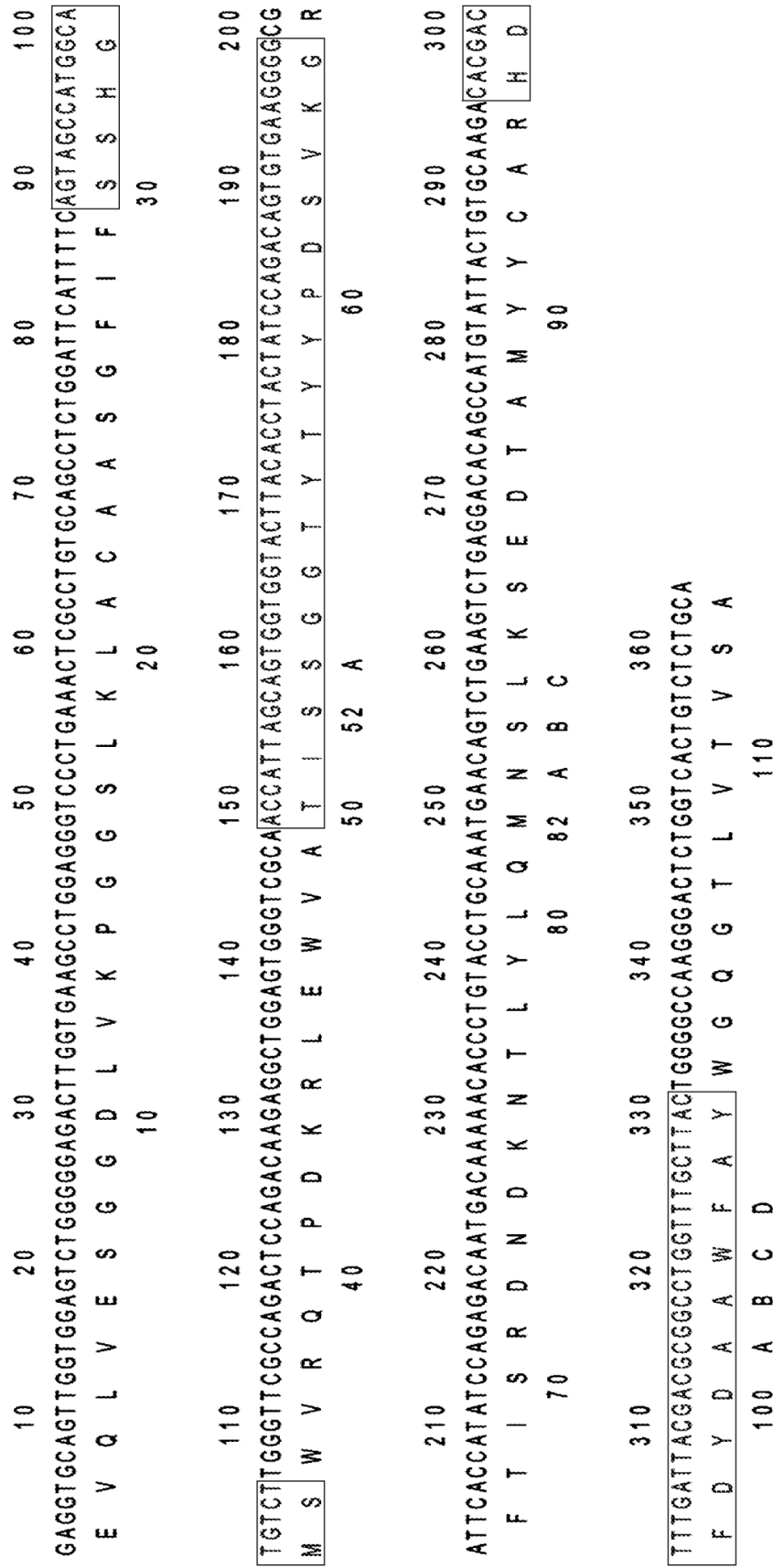


FIG. 14

Secuencias de cadena ligera de hibridoma 5F4/2C6/2H3

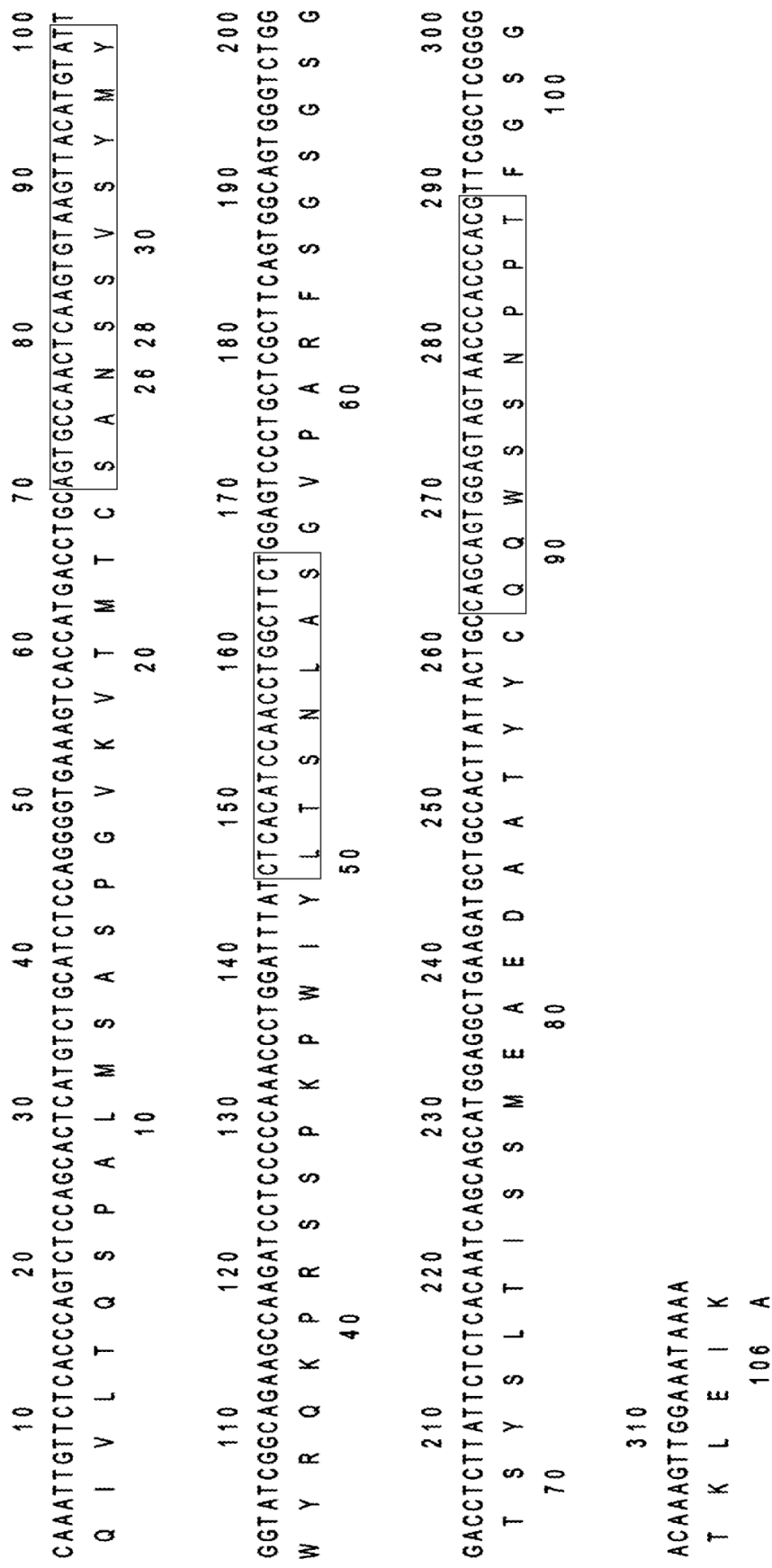


FIG. 15

Secuencias de cadena pesada de hibridoma 34B1/2E8/2E6

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																											
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTAGTGAAGCCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCGTGTCAGCCCTCTGGATTACATTTTCAGTTTCTATGGCA																																				
E	V	Q	L	V	E	S	G	D	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	F	Y	G					
										10											20											30				
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																											
TGTCCTTGGGTTGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTGGCGCAACCTTTAGTGGTGGTGGTAATTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCG																																				
M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	W	V	A	T	F	S	G	G	N	Y	T	Y	Y	P	D	S	V	K	G	R				
										40											50	52	A											60		
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																											
ATTCACCAATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCCCTTACCTCCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCAGGTATTACTGTGCAAGACATGGG																																				
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D	T	A	R	Y	Y	C	A	R	H	G				
										70											80	82	A	B	C											90
310	320	330	340	350	360																															
GGGTTACCAATTTTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA																																				
G	L	P	F	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	T	S	V	T	V	S	S																		
						100	A	B	C							110																				

FIG. 16

Secuencias de cadena ligera de hibridoma 34B1/2E8/2E6

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAAATTGTGATCACCAGTCTCCAGCACTCATGGCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATCACCTGCAGTGTCTCCTCAAGTATAAGTTCAGCAACT									
E I V I T Q S P A L M A A S P G E K V T I T C S V S S S I S S S N									
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100									
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200									
TGCACITGGTACCAGCAGAAGTCAGAAACCTCCCCCAACCCCTGGATTATGGCACATTTAACCTGGCTTCTGGAGTCCCCTGTTCCGCTTCAGTGGCAGTGG									
L H W Y Q Q K S E T S P K P W I Y G T F N L A S G V P V R F S G S G									
40 50 60									
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300									
ATCTGGGACCTCTTATTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTCACCCATTACAGTTCGGC									
S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S H P F T F G									
70 80 90									
310 320									
TCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA									
S G T K L E I K									
100 106 A									

FIG. 17

Secuencias de cadena pesada de hibridoma 26H7/2H9/2E10

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																							
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGCTTTGTGAAGCCTGGAGGTCCTGTCAGCCCTCTGGATTCTCTTTCAGTGACTATTACT																																
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	F	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	S	F	S	D	Y	Y	
										10											20											30

110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																									
TGTATTGGGTTCCGCAGACTCCGGAAAAAAGGCTGGAGTGGGTCCCA	ACCATTAGTGTGGTGGTAAACACCTCCTATCCGGACAGTGTGAAGGGGCG																																	
L	Y	W	V	R	Q	T	P	E	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	V	G	G	N	T	S	Y	P	D	S	V	K	G	R		
										40											50	52	A											60

210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																											
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCCATGTATTACTGTACAAGGGGCCTT																																				
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	N	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	T	R	G	L				
										70											80	82	A	B	C											90

310	320	330	340	350	360																				
TACTACGGCCCCGGCCTGGTTTGCCTTACTGGGGCCCAAGGACTCTGGTCACCTGCTCTGCA																									
Y	Y	G	P	A	W	F	A	Y	W	G	Q	T	L	V	T	V	S	A							
										100	A	B	C											110	

FIG. 18

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGTCAGTAGGACAGAAGGTCACATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGGCCTTTTAAATAGTAGCA									
D I V M T Q S P S S L A M S V G Q K V T M S C							K S S Q S L L N S S		
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ATCAAAAGAACTATTTGGCC									
N Q K N Y L A									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
ATCAAAAGAACTATTTGGCC									
W F Q Q Q T P G Q S P K L L V Y									
30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
CTTCATAGGCAGTGGTCTGGGACAGATTTCACCTTACCATCAGCAGTGTGAAGCTGAGGACCTGGCAGATTACTTCTGTCTAGCAACATTATAGCACT									
F I G S G S G T D F T L T I S S V K A E D L A D Y F C									
70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
CCGTGGACG									
P W T									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CCGTGGACG									
F G G G T K L E I R									
100	110	120	130	140	150	160	170	180	190

FIG. 19

Secuencias de cadena ligera de hibridoma 26H7/2H9/2E10 (secuenc. 2)

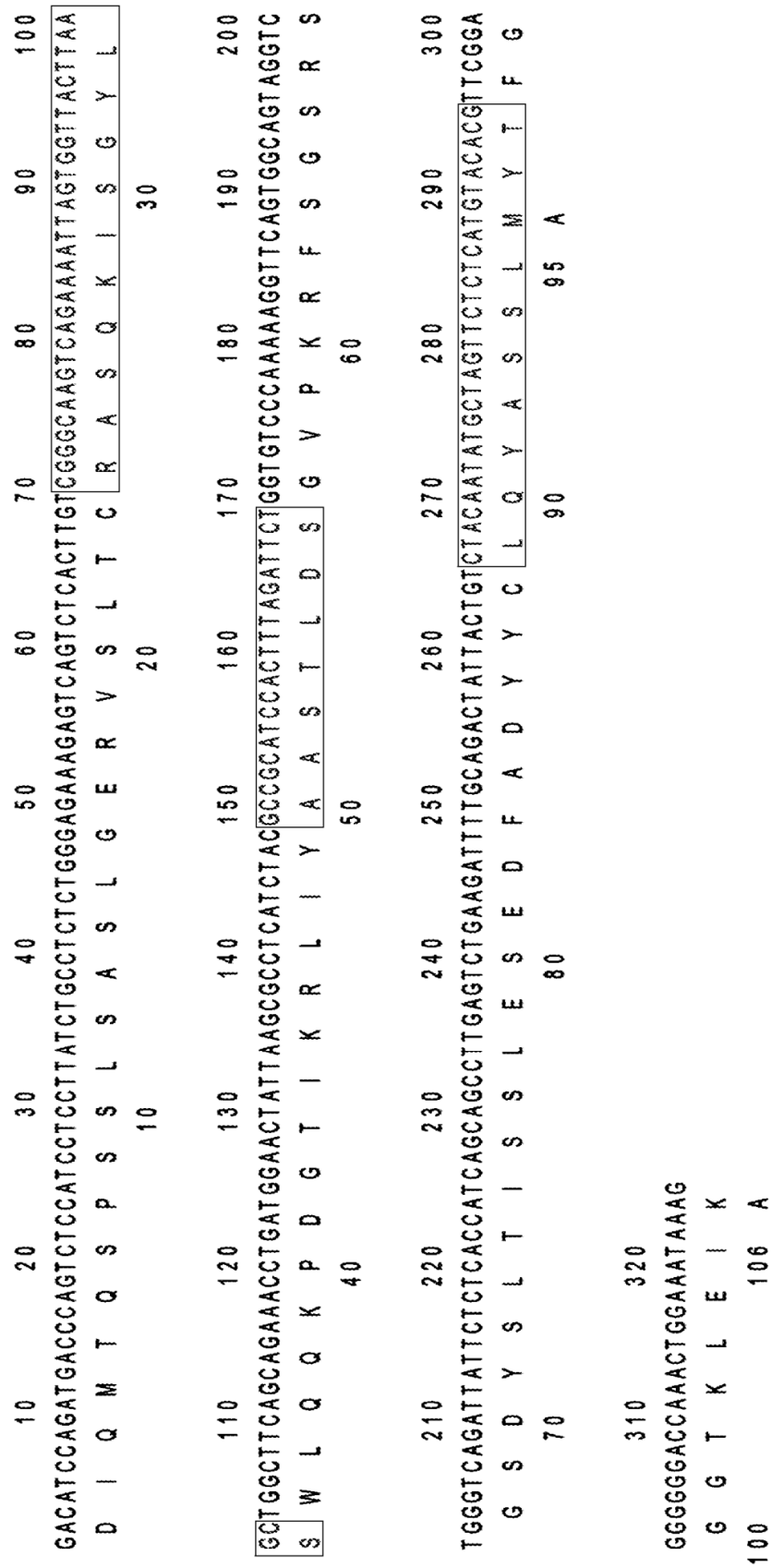


FIG. 19 (cont.)

○ N.º 71
 □ N.º 72
 △ N.º 73

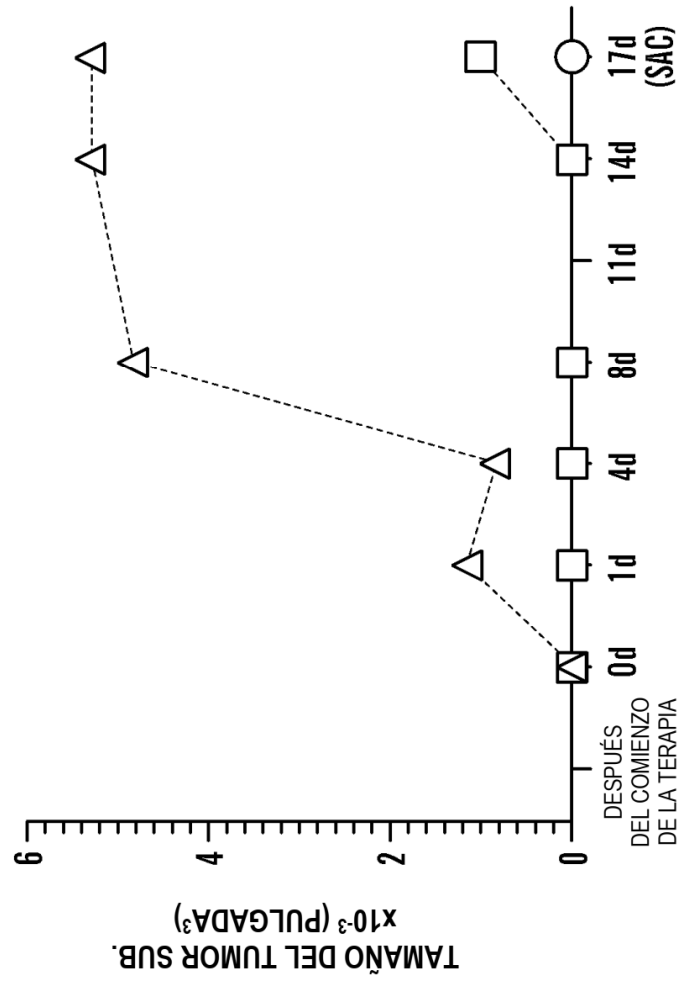


FIG. 20

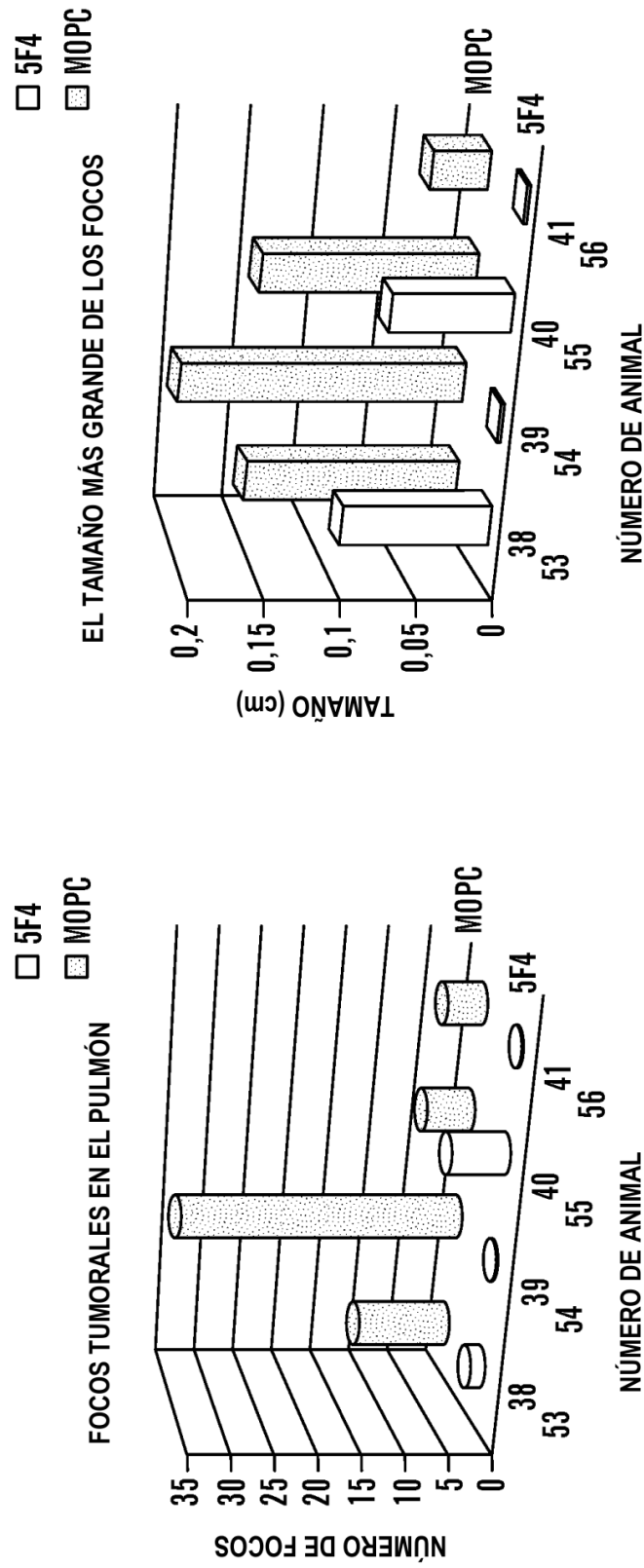


FIG. 21