



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 975 528**

⑮ Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2020 PCT/IB2020/058690**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2021 WO21053587**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2020 E 20776239 (4)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024 EP 4013512**

④ Título: **Anticuerpos biespecíficos contra ceacam5 y cd3**

⑩ Prioridad:

**18.09.2019 EP 19198124
18.09.2019 US 201962902150 P**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2024

⑬ Titular/es:

**LAMKAP BIO ALPHA AG (100.0%)
Bahnhofstrasse 1
8808 Pfaeffikon, CH**

⑭ Inventor/es:

**MAJOCCHI, SARA y
STREIN, KLAUS**

⑮ Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 975 528 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 biespecíficos contra ceacam5 y cd3

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que se unen al antígeno carcinoembrionario humano CEACAM5 (CEA) y humano CD3ε (anticuerpo biespecífico CEAxCD3). Además, la presente invención se refiere a 10 polinucleótidos que codifican tales anticuerpos biespecíficos y vectores y células huésped que comprenden dichos polinucleótidos. La invención se refiere además a métodos para seleccionar y producir dichos anticuerpos y a métodos de utilización de dichos anticuerpos para uso en el tratamiento de enfermedades.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 El tratamiento exitoso del cáncer sólido avanzado/metastático como, por ejemplo, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, etc., siguen siendo un desafío. La inmunoterapia moderna contra el cáncer ha introducido métodos/técnicas para ayudar a las células inmunitarias del cuerpo a atacar y destruir mejor las células cancerosas. Por ejemplo, se han desarrollado varias técnicas/métodos para aumentar el ataque de las células tumorales 20 por las células T. Son ejemplos los inhibidores de puntos de control inmunitario como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales inhibidores de PD-1/PD-L1, anticuerpos biespecíficos de células T que se unen a un antígeno asociado al tumor (TAA) y CD3 en células T o células CAR-T. Las células CAR-T y los anticuerpos biespecíficos son eficaces en neoplasias malignas hematológicas y están aprobados, por ejemplo, para el tratamiento de neoplasias malignas de células B o leucemia linfocítica aguda ALL, pero hasta ahora no ha habido un avance real de estos métodos en la terapia de 25 cáncer sólido avanzado/metastático. Los anticuerpos monoclonales y también los anticuerpos biespecíficos usados en la terapia pueden causar diversos efectos adversos. Un problema de toxicidad importante es el síndrome de liberación de citocinas (CRS), que se encontró, por ejemplo, en el tratamiento con alemtuzumab, muromonab-CD3, rituximab, tosituzumab y el anticuerpo biespecífico CD19xCD3.

30 Tabernero et.al. (J Clin Oncol 35, 2017 (suppl. abstr. 3002)) presentado en ASCO 2017 datos clínicos de fase 1 en pacientes con cáncer colorrectal avanzado/metastático con un anticuerpo biespecífico CEAxCD3 (RO 6958688, cibisatamab, véase más abajo) en monoterapia y en combinación con el anticuerpo anti-PD-L1 atezolizumab. Cibisatamab tiene el llamado formato 2+1, con un fragmento Fab que se une a CD3 y con dos fragmentos Fab que se unen a CEA. Tales anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos de patente US20140242079 (WO2014131712) y 35 US20140242080 (WO2014131711).

35 Tal como se utiliza en el presente documento "TCB2014" se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une a CEA y CD3 en el formato 2+1 descrito en el documento de patente US20140242080, que comprende como CDR las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 270-276 y 290-296 del documento de patente US20140242080 (véase también las CDR de las SEQ ID NO: 4-10 y 24-30 del documento de patente US20140242079).

40 Tal como se utiliza en el presente documento, "TCB2017" se refiere a la molécula B en el formato "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en el aglutinante de CD3, modificación de carga en el aglutinante de CEA, aglutinante de CEA humanizado) como se describe en el documento de patente WO2017055389 que comprende como CDR las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 4-6, 8-10 y 14-19 del documento de patente 45 WO2017055389.

50 La estructura 2+1 es bastante diferente de los anticuerpos IgG nativos. La estructura contiene también puentes artificiales de aminoácido (aa) y dos cadenas pesadas diferentes unidas por knob en secuencias de tecnología de orificios/secuencias aa en la parte Fc (véase, por ejemplo, los documentos de patente US6737056, WO2013055958). Tales anticuerpos biespecíficos (por ejemplo RO6958688, cibisatamab) son inmunogénicos y, por lo tanto, provocan la 55 formación de anticuerpos antifármacos (ADA) y la pérdida de exposición al fármaco debido a la neutralización del fármaco por ADA. Melero et al presentaron, a dosis de 60-200 mg, 50 % o más de los pacientes con ADA y en 45 % de pacientes pérdida de exposición (Melero et al., ASCO 2017, Resumen 2549 y Póster N° 41, Resumen véase Journal of Clinical Oncology 35, nº 15_suppl (20 de mayo de 2017) 2549-2549). La pérdida de exposición hace que la terapia sea difícil de controlar y disminuye significativamente la probabilidad de éxito. Para minimizar la formación de ADA, cibisatamab, respectivamente, se prueba clínicamente la combinación de cibisatamab y atezolizumab en combinación después de tratamiento previo con el anticuerpo anti-CD20 obinutuzumab (véase ClinicalTrials.gov Trial NCT03866239). El tratamiento previo se administra para depletar las células B de los pacientes con carcinomas colorrectales metastáticos. La depleción de células B conduce a una disminución de inmunoglobulinas del paciente y, por lo tanto, de ADA potenciales, pero al mismo tiempo conduce a un debilitamiento del sistema inmunológico.

60 MEDI-565 (AMG211), otro anticuerpo biespecífico CEAxCD3, un anticuerpo de cadena única, ha estado en desarrollo clínico y los resultados se han publicado (véase, por ejemplo, M. Pishvaian et al. Clin Colorectal Cancer. 2016 DEC; 15(4) 345-351). El estudio NCT01284231 (ClinicalTrials.gov) se ha presentado como completado, no se ha iniciado un nuevo ensayo en los últimos años. Este anticuerpo biespecífico de cadena simple (dos scFv conectados por un enlace) tiene

una vida media de eliminación extremadamente baja, entre 2,2 y 6,5 horas (Pishvaian et al.; Clin. Colorectal Cancer, 2016 DEC; 15(4) 345-351).

5 La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico CEAxCD3 menos inmunogénico con eficacia elevada. Tal anticuerpo comprende una cadena pesada común y, en una realización, una cadena ligera kappa en la parte de unión a CEA y una cadena ligera lambda en la parte de unión a CD3.

10 El concepto de utilización de una cadena pesada común para obtener anticuerpos biespecíficos se menciona en Fischer et al., Nature Communications 6 (2015): 6113. <https://doi.org/10.1038/ncomms7113> and Magistrelli G. et al., MABS 9 (2017) 231-239. Los anticuerpos biespecíficos kappa lambda se describen, por ejemplo, en el documento de patente WO2014087248 (incorporado al presente documento de patente por referencia en su totalidad). Su estructura es casi indistinguible de la estructura de un IgG nativo con la consecuencia de una formación de ADA nula o mínima y, por lo tanto, una pérdida de exposición mínima. La secuencia de la región variable de cadena pesada común VH y la secuencia huCD3 VL 1A4 de la invención se describen en el documento de patente WO2019175658 (US2019/0284297).

15 20 Como se mencionó anteriormente, el documento de patente WO2017055389 describe anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 con el formato 2+1 pero que se unen a un dominio diferente como cibisatamab. Uno de estos anticuerpos (RO7172508 o RG 6123) se ha probado en un ensayo clínico en pacientes con tumores sólidos localmente avanzados y/o metastáticos positivos para CEA (ClinicalTrials.gov; búsqueda de RO7172508), también con obinutuzumab previo al tratamiento y en combinación con atezolizumab. Según la descripción del ensayo clínico en ClinicalTrials.gov para algunas cohortes se requirieron niveles séricos de CEA (CEACAM5 soluble desprendido, sCEA) por debajo de un cierto umbral en los pacientes a tratar para que fueran elegibles para el tratamiento, lo que sugiere que niveles más elevados de CEACAM5 soluble desprendido pueden disminuir la eficacia de este anticuerpo biespecífico CEAxCD3. Los anticuerpos de la presente invención muestran una influencia mínima de los CEA solubles desprendidos en su eficacia en la destrucción de células tumorales.

25 30 35 CEACAM5 soluble desprendido es un marcador tumoral establecido. Los niveles de sCEA en el plasma de pacientes con cáncer pueden superar 1000 ng/ml, mientras que las concentraciones plasmáticas en individuos sanos son inferiores a 10 ng/ml (por ejemplo Sandler B. et al Anticancer Res 1999, 19(5B), 4229-33). Por lo tanto, los CEACAM5 solubles desprendidos pueden competir con los CEA unidos a membrana presentes en células tumorales para la unión de anticuerpos anti-CEA terapéuticos y anticuerpos anti-CEA biespecíficos, lo que podría causar una disminución de la eficacia de un anticuerpo anti-CEA o un anticuerpo CEAxCD3. TCB2017 y TCB2014 (véase más arriba) han sido probados por los inventores in vitro en una prueba de lisis mediada por células T de células tumorales positivas en presencia de CEA soluble. Se descubrió que la adición de sCEA a la prueba desplaza la curva de lisis y, por lo tanto, el valor de EC50 de TCB2014 y TCB2017 a concentraciones más elevadas, lo que sugiere que tanto TCB2014 como TCB2017 se unen significativamente a sCEA.

40 45 50 55 La familia de CEA humano contiene 29 genes, de los cuales se expresan 18: 7 pertenecen al subgrupo CEA y 11 al subgrupo de glicoproteínas específicas del embarazo. Se cree que varios miembros de subgrupos de CEA poseen propiedades de adherencia celular. CEACAM5 no solo se expresa en células de cancer colorrectal, sino también en el cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cancer de pulmón y otros tipos de cáncer. Se cree que CEACAM5 desempeña un papel en la inmunidad innata (Hammarström S., Semin. Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)). El antígeno carcinoembrionario 5 (CEA, CEACAM5 o CD66e; UniProtKB - P06731) es un miembro de la molécula de adhesión celular relacionada con antígenos carcinoembrionarios (familia CEACAM) y un antígeno asociado a tumores (Gold and Freedman, J Exp. Med., 121:439-462, 1965; Bernstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002). Se han generado múltiples anticuerpos monoclonales contra CEACAM5 con fines de investigación, como herramientas de diagnóstico y con fines terapéuticos (véase, por ejemplo, el documento de patente WO2012117002). Los miembros de la familia de antígenos carcinoembrionarios (CEACAMs) están ampliamente expresados y, dependiendo del tejido, son capaces de regular diversas funciones, incluida la promoción tumoral, la supresión tumoral, la angiogénesis y la activación de neutrófilos. Cuatro miembros de esta familia, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6 y CEACAM8, se expresan y se enriquecen en neutrófilos humanos (<http://www.proteinatlas.org>). Dado el mecanismo de acción de anticuerpos biespecíficos CEAxCD3, la reactividad cruzada con otros CEACAM podría conducir a la depleción de poblaciones importantes de células sanas circulantes. Por ejemplo, la reactividad cruzada con CEACAM8, que se expresa por neutrófilos o células madre hematopoyéticas, podría conducir a la depleción de tales poblaciones celulares. La invención proporciona un anticuerpo biespecífico CEAxCD3 con baja reactividad cruzada a uno o más de los miembros de la familia CEACAM, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM 19, CEACAM20 y CEACAM21.

60 65 El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CEACAM5 PR1A3 se generó mediante la fusión de células de mieloma NS1 (P3/NS I/I-Ag-4-1) con células de bazo de ratones inmunizados con epitelio colorrectal normal. Richman P. I. y Bodmer W. F., Int. J. Cancer, 39:317-328, 1987 describen el anticuerpo monoclonal de ratón PR1A3. El mapeo de epítopos de PR1A3 muestra que el anticuerpo se dirige al dominio B3 y al anclaje GPI de la molécula CEA (Durbin H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4313-4317, 1994). El epítopo unido por PR1A3 es un epítopo conformacional, no un epítopo lineal (Stewart et al., Cancer Immunol. Immunother., 47 (1999) 299-06). Los anticuerpos PR1A3 (hPR1A3) humanizados se describen, por ejemplo, por Conaghan P. J., et al., Br. J. Cancer, 98 (2008) 1217-1225 y el documento de patente WO2012117002. El aglutinante de CEA utilizado en TCB2014 (llamado CH1A1A) es una versión humanizada, madurada por afinidad y

diseñada para la estabilidad derivada del anticuerpo PR1A3. M. Bacac et.al., Clin. Cancer Research 22(13):3286-97 (2016), Conaghan P, et al., Br J Cancer 2008;98:1217-25, y Durbin H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:4313-7).

- 5 Un método para el tratamiento del cáncer mediante una combinación de un antagonista de eje PD-1 humano y un anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD3 se menciona en el documento de patente WO2017118657 y los resultados clínicos se han publicado en ASCO conference 2017 (Tabernero et al, J Clin Oncol 35, 2017 (suppl. abstr. 3002)). En el documento de patente WO2015112534 se menciona un método de tratamiento de tumores mediante la administración de antagonistas del punto de control inmunitario que se unen a dos o más dianas diferentes de una vía del punto de control inmunitario, y un agente de redirección de linfocitos T que se une a CEA y a un antígeno de superficie de linfocitos T. Un conjugado que consiste en un anticuerpo anti-CEACAM6 de dominio único y ureasa se encuentra actualmente en ensayos clínicos (NCT02309892; documento de patente WO2016116907). En el documento de patente US20110064653 se menciona un anticuerpo de clase I que se une a CEACAM5, CEACAM6 y granulocitos. En el documento de patente WO2018053328 se mencionan anticuerpos biespecíficos que comprenden una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, unidos covalentemente entre sí.
- 10 15 Un anticuerpo anti-CD3 ϵ descrito en el estado de la técnica es SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137: 1097-1100). SP34 reacciona con CD3 tanto de primate como humano. SP34 está disponible de BD Biosciences. Otro anticuerpo anti-CD3 descrito en el estado de la técnica es UCHT-1 (véase el documento de patente WO2000041474). Otro anticuerpo anti CD3 descrito en el estado de la técnica es BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; used in Phase I/II trials of GvHD, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)). SP34 difiere de UCHT-1 y BC-3 en que SP-34 reconoce un epítopo presente únicamente en la cadena ϵ de CD3 (véase Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047) mientras que UCHT-1 y BC-3 reconocen un epítopo aportado por las cadenas tanto ϵ como γ . También se describen anticuerpos anti CD3 en los documentos de patente WO2007042261, WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837, WO2010037838 y US8236308. Los anticuerpos biespecíficos que comprenden una parte de unión específica para CEA y una parte de unión específica para CD3 ϵ se describen, por ejemplo, en los documentos de patente US20140242079, WO2007071426, WO2013012414, WO2015112534, WO2017118675 y WO2017055389. Un anticuerpo anti CD3 que comprende secuencias de la segunda parte de unión de un anticuerpo según la invención se menciona en los documentos de patente US62/643,095 y PCT/US2019/000232.
- 20 25 30 El documento de patente US2012321626 menciona una proteína de fusión Fab multiespecífica que comprende un fragmento Fab que se une al extremo N-terminal de CD3 ϵ . El documento de patente WO2018199593 menciona anticuerpos biespecíficos que se unen a HER3 y CD3.
- 35 40 45 Como ya se ha mencionado anteriormente, los resultados de los primeros ensayos clínicos con anticuerpos biespecíficos de células T TAA x CD3 (TAA = Antígeno Asociado a Tumor) en pacientes con tumores sólidos avanzados fueron decepcionantes, pero recientemente se han publicado resultados preliminares de fase 1 para el anticuerpo biespecífico CEAxCD3 cibisatamab (RO6958688, véase, por ejemplo, Bacac et al Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97 (2016); y el documento de patente US20140242079) mostrando respuestas parciales de inhibición y enfermedad estable en pacientes con cáncer colorrectal avanzado en monoterapia y en combinación con PD-L1 (J.Tabernero et.al., J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002)). Otro enfoque para obtener mejores resultados podría ser añadir a los anticuerpos biespecíficos de células T no solo un inhibidor del eje de puntos de control PD-1, sino añadir más inhibidores o agonistas de puntos de control. No obstante, hasta ahora se cree que no hay datos clínicos prometedores disponibles para este enfoque combinado.
- 50 55 60 La disponibilidad limitada de células T dentro de tumores sólidos avanzados es sin duda un mecanismo importante que limita la eficacia que se puede lograr con anticuerpos biespecíficos de células T más inhibidores del eje PD-1.
- En lugar de añadir a la combinación de un anticuerpo biespecífico de células T y un inhibidor del eje PD-1 otro agente terapéutico destinado a redirigir las células T contra células tumorales de tumores sólidos avanzados, puede ser más eficaz añadir un agente terapéutico que redirija a las células tumorales otras células inmunitarias, especialmente macrófagos o macrófagos y células asesinas naturales (NK).
- La presente invención proporciona nuevos anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 que están diseñados de manera que puedan administrarse en paralelo con anticuerpos biespecíficos CEAxCD47 que redirigen macrófagos y también células NK contra tumores sólidos que expresan CEA. El ataque combinado de células T y macrófagos y células NK dirigidas a tumores que expresan CEA ofrece una oportunidad considerable para una eficacia superior, destrucción y fagocitosis de células tumorales que expresan CEA.
- Los resultados hasta ahora decepcionantes con células CAR-T en tumores sólidos pueden tener una explicación simple: el número de células CAR-T que penetran en el tumor sólido y se distribuyen en él es simplemente insuficiente. Esto es ciertamente diferente en la mayoría de las neoplasias malignas hematológicas; las células T-CAR pueden acceder bien a las células tumorales, lo que explica la diferencia de alta eficacia en estas neoplasias malignas frente a la decepcionante eficacia en tumores sólidos. Además, las células CAR T pueden estar fuertemente suprimidas por el microambiente tumoral (TME) de los tumores sólidos, que es fuertemente inmunosupresor en su mayoría.

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos biespecíficos anti-CEAxCD3 con alta eficacia, baja influencia de sCEA en la eficacia, baja o nula reactividad cruzada a CEACAM diferentes a CEACAM5 (= CEA) y, por lo tanto, toxicidad disminuida, baja inmunogenicidad, la oportunidad de terapia combinada paralela con anticuerpos CEAxCD47 y con valiosas propiedades farmacocinéticas.

5

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

- 10
- La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico (también llamado "bsAb CEAxCD3" o "anticuerpo biespecífico CEAxCD3") que comprende una primera parte de unión, unida específicamente a CEACAM5 humano (también llamado "CEA") y una segunda parte de unión, unida específicamente a CD3 ϵ humano (llamada además "CD3").

15

En una realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo es monovalentes para la primera parte de unión y monovalentes para la segunda parte de unión.

20 En una realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que las secuencias de regiones marco constantes y variables son humanas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que cada una de las partes de unión primera y segunda comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina.

25

En una realización, el anticuerpo biespecífico tiene una primera parte de unión que comprende una cadena pesada y una segunda parte de unión que comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada en cada parte de unión es la misma (es decir, una cadena pesada común). En una realización, la región variable de cadena pesada común comprende como CDR CDRH1 de SEQ ID NO: 2, CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y CDRH3 de SEQ ID NO: 4. En una realización, la región variable de cadena pesada común es de SEQ ID NO: 1. En una realización, la cadena pesada constante común es de SEQ ID NO: 30. En una realización, la cadena pesada común es de SEQ ID NO: 43. En una realización, la cadena pesada común es de SEQ ID NO: 44. En una realización, la cadena pesada común es de SEQ ID NO: 45.

35

En una realización, el anticuerpo biespecífico está caracterizado por que comprende, en la primera parte de unión y en la segunda parte de unión como cadena pesada, una cadena pesada común que comprende en la primera parte de unión una cadena ligera kappa como cadena ligera y en la segunda parte de unión una cadena ligera lambda como cadena ligera. En una realización, la cadena ligera de la segunda parte de unión es de SEQ ID NO: 28 y la cadena pesada de la segunda parte de unión es de SEQ ID NO: 45 (por ejemplo anticuerpos biespecíficos derivados de AB1 y AB-1L3-1/N como AB17L3-1/N,

40

AB54L3-1/N, AB60L3-1/N, AB66L3-1N, AB71L3-1/N, AB72L3-1/N y

AB73L3-1/N; para secuencias de CDR y VL véase la lista de secuencias).

45

AB13,14,15 etc. indican una primera parte de unión (ramas de anticuerpos anti-CEACAM5) y L3-1 indica una segunda parte de unión (rama de anticuerpos anti-CD3, también llamada 1A4) de anticuerpos biespecíficos de esta invención. Cualquier rama de anticuerpos ABXX anti CEA puede combinarse con la rama L3-1 anti CD3 para formar un anticuerpo biespecífico: por ejemplo ABXXL3-1 indica un anticuerpo biespecífico CEAxCD3 según la invención, que comprende una parte WT hlgG1 Fc; ABXXL3-1/D indica un anticuerpo biespecífico CEAxCD3 según la invención, que comprende una parte hlgG1 Fc que porta las mutaciones L234A + L235A; ABXXL3-1/N indica un anticuerpo biespecífico CEAxCD3 según la invención, que comprende una parte hlgG1 Fc que porta las mutaciones L234A + L235A + P329A.

55

En una realización útil para comprender la invención, el anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión y la segunda parte de unión una cadena pesada común como cadena pesada, que comprende en la primera parte de unión una región de tipo lambda como región variable de cadena ligera y una región de tipo kappa como región constante de cadena ligera ("cadena ligera de formato híbrido"), y en la segunda parte de unión una cadena ligera lambda como cadena ligera (por ejemplo L3-1AB8 H-CK5 /D, no comprendida por las reivindicaciones, véase la Figura 2 y la descripción de la Figura 2).

60

En un aspecto útil para comprender la invención, el anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión y la segunda parte de unión una cadena pesada común como cadena pesada, que comprende en la primera parte de unión una región de tipo lambda como región variable de cadena ligera y una región de tipo lambda como región constante de cadena ligera y en la segunda parte de unión una región de tipo lambda como región variable de cadena ligera y una región de tipo kappa como región constante de cadena ligera ("cadena ligera de formato híbrido"); por ejemplo AB8L3-1 H-CK5/D, no comprendida por las reivindicaciones.

- Los anticuerpos biespecíficos de la invención muestran baja unión/reactividad cruzada a miembros de la familia CEACAM diferentes a CEACAM5. En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra que el valor de MFI para la unión a células PEAKrapid (ATCC® CRL-2828™) que expresan un CEACAM seleccionado a partir del grupo que consiste en CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20 y CEACAM21 no es más de 2 veces en comparación con el valor de MFI para la unión a las células WT PEAK (es decir, células PEAK no transfectadas) bajo las mismas condiciones experimentales. En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra un valor de MFI para la unión a células
- 5 PEAKrapid que expresan un CEACAM seleccionado a partir del grupo que consiste en CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM6 y CEACAM8 que no es más de 2 veces en comparación con el valor de MFI para la unión a células WT PEAK bajo las mismas condiciones experimentales. En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra un valor de MFI para la unión a células
- 10 PEAKrapid que expresan un CEACAM8 que no es más de 2 veces en comparación con el valor de MFI para la unión a células WT PEAK bajo las mismas condiciones experimentales. El procedimiento experimental para la transfección de células PEAK y la medición de la unión de anticuerpos a estas células PEAK se describe en los Ejemplos 1 y 5.
- 15 En una realización, el anticuerpo biespecífico se une a células MKN-45 (DSMZ No: ACC 409) con un valor de EC50 de 0,5 nM a 50 nM. En una realización, el anticuerpo biespecífico se une a las células MKN-45 con un valor EC50 de 0,5 nM a 30 nM. En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra un valor de MFI para la unión a células MKN-45 a
- 20 200 nM, 1000 nM y 5000 nM es al menos el doble del valor de MFI obtenido con TCB2014. El ensayo de unión se describe en el Ejemplo 7a. En una realización, la EC50 para la destrucción de la línea celular tumoral MKN-45 medida en el ensayo que contiene PBMC humana, para los anticuerpos biespecíficos de esta invención, es 40 % o más inferior que la EC50 medida para TCB2014. En una realización, la EC50 para la destrucción de la línea celular tumoral LS-174T medida en el ensayo que contiene PBMC humana, para los anticuerpos biespecíficos de esta invención, es 40 % o más inferior que la EC50 medida para TCB2014.
- 25 30 En una realización, el anticuerpo biespecífico está destruyendo células LS174T en un ensayo que contiene PBMC humana de manera dependiente de la concentración con un valor de EC50 de 0,01 a 10 nM. En una realización, el anticuerpo biespecífico está destruyendo células LS174T en un ensayo que contiene PBMC humana de manera dependiente de la concentración con un valor de EC50 de 0,01 a 1 nM.
- 35 En el Ejemplo 8 se describe un ensayo para la medición de la lisis/destrucción redirigida de células T de células CEA positivas.
- 40 En una realización, el valor de EC50 para el anticuerpo biespecífico en el mismo ensayo (destrucción de células tumorales LS 174T CEA positivas) no se incrementa en más de un factor de 20, en una realización no más de 15 y en una realización no más de 10, en presencia de 5 µg/ml de CEACAM5 soluble, en comparación con el valor de EC50 para lisis sin CEACAM5 soluble bajo las mismas condiciones experimentales.
- 45 En otra realización, el valor de EC50 para el anticuerpo biespecífico en el mismo ensayo no se incrementa en más de un factor de 10 y en una realización no más de 5, en presencia de 1 µg/ml de CEACAM5 soluble, en comparación con el valor de EC50 para lisis sin CEACAM5 soluble bajo las mismas condiciones experimentales.
- 50 En una realización, el anticuerpo biespecífico inhibe el crecimiento del volumen tumoral en un modelo HPAF-II hasta el día 18 en 25 % o más en comparación con el crecimiento del volumen tumoral en el grupo vehículo bajo las mismas condiciones experimentales. En una realización, el anticuerpo biespecífico inhibe el crecimiento del volumen tumoral en un modelo HPAF-II hasta el día 18 análogamente y sin diferencia de manera estadísticamente significativa en comparación con TCB2014 bajo las mismas condiciones experimentales. El modelo de tumor de ratón se describe en el Ejemplo 9a.
- 55 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en cada subunidad del dominio Fc sustituciones de aminoácido que reducen la unión a un receptor Fc activador y/o reducen la función efectora, en donde dichas sustituciones de aminoácido son L234A y L235A y/o una sustitución de P329, seleccionada a partir del grupo que consiste en P329A, P329G y P329R (numeración del índice de Kabat EU). En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en cada subunidad del dominio Fc sustituciones de aminoácido L234A y L235A y P329A (numeración del índice de Kabat EU). L234A y L235A (LALA) significa que el aminoácido leucina en la posición 234/235 es sustituido por alanina. P329A (PA) significa que el aminoácido leucina en la posición 329 es sustituido por alanina.
- 60 65 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada común. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada común que comprende como CDR CDRH1 de SEQ ID NO: 2 y CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y CDRH3 de SEQ ID NO: 4. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en la segunda parte de unión una región de cadena ligera que comprende como CDR CDRL1 de SEQ ID NO: 18, CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y CDRL3 de SEQ ID NO: 20.

- En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión como región constante de cadena ligera una región de SEQ ID NO: 39. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión como región constante de cadena ligera una región de SEQ ID NO: 41. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión como región constante de cadena ligera una región de SEQ ID NO: 58. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 43 o una cadena pesada común de SEQ ID NO: 44 o una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión como región constante de cadena ligera una región de SEQ ID NO: 39 y una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45.
- 5 10 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en la segunda parte de unión como cadena ligera una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 29 o del grupo de cadena ligera (LC) de formato híbrido de SEQ ID NO: 67, 68, 69 y 71.
- 15 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión como región constante de cadena ligera una región de SEQ ID NO: 39, una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45 y en la segunda parte de unión una cadena ligera de SEQ ID NO: 28.
- 20 En una realización, el anticuerpo biespecífico compite con un anticuerpo anti-CEA, que comprende como dominios VL y VH VL y VH de secuencias SEQ ID NO: 48 y 49 (anticuerpo anti-CEA MEDI).
- 25 30 En una realización fuera de las reivindicaciones, un anticuerpo compite con un anticuerpo anti-CEA, que comprende como dominios VL y VH VL y VH de secuencias SEQ ID NO: 46 y 47 (anticuerpo SM3E), que comprende como dominios VL y VH VL y VH de secuencias SEQ ID NO: 56 y 57 (Labetuzumab (Lab)), que comprende como dominios VL y VH VL y VH de secuencias SEQ ID NO: 50 y 51 (SAR), que comprende como dominios VL y VH VL y VH de secuencias SEQ ID NO: 54 y 55 (T86.66), que comprende como dominios VL y VH VL y VH de secuencias SEQ ID NO: 52 y 53 (CH1A1A). Véase también la Figura 1 y el Ejemplo 5c).
- 35 Son ejemplos de anticuerpos útiles como regiones CEA VL o CL que compiten con MEDI para la unión a CEA recombinante el anticuerpo anti-CEA AB1 y los anticuerpos obtenidos mediante optimización de principios activos de AB1 (véase el Ejemplo 11 para el método experimental). Los anticuerpos anti-CEA AB13, 14, 15, 17, 20, 54, 60, 66, 71, 72, 73 y los respectivos anticuerpos biespecíficos anti CEAXCD3 AB13L3-1, AB14L3-1, AB15L3-1, AB17L3-1, AB20L3-1, AB54L3-1, AB60L3-1, AB66L3-1, AB71L3-1, AB72L3-1 y AB73L3-1 compiten de la misma manera que el anticuerpo AB1, o bien AB1L3-1. Son ejemplos de anticuerpos útiles como regiones CEA VL o CL en anticuerpos biespecíficos ajenos a las reivindicaciones y que compiten con SM3E para la unión a CEA recombinante el anticuerpo anti-CEA AB8 y anticuerpos obtenidos mediante mutagénesis de AB8 dirigida por oligonucleótidos, utilizando oligonucleótidos degenerados. Son ejemplos de anticuerpos útiles como regiones CEA VL o CL en anticuerpos biespecíficos ajenos a las reivindicaciones y que compiten con T84.66 para la unión a CEA recombinante el anticuerpo anti-CEA 1B4 y anticuerpos obtenidos mediante mutagénesis de 1B4 dirigida por oligonucleótidos, utilizando oligonucleótidos degenerados.
- 40 45 Son ejemplos de anticuerpos útiles como regiones CEA VL o CL en anticuerpos biespecíficos ajenos a las reivindicaciones, pero que no compiten con ninguno de los anticuerpos de referencia para la unión a CEA recombinante, el anticuerpo anti-CEA C11 y anticuerpos obtenidos mediante mutagénesis de C11 dirigida por oligonucleótidos, utilizando oligonucleótidos degenerados.
- 50 55 AB1 es un anticuerpo anti-CEA con HC SEQ ID NO: 43 y LC kappa SEQ ID NO: 40, codificado por las secuencias de ácido nucleico mostradas en las SEQ ID NO: 80 y 78 respectivamente. AB8 es un anticuerpo anti-CEA con HC SEQ ID NO: 43 y LC lambda SEQ ID NO: 42, codificado por las secuencias de ácido nucleico mostradas en las SEQ ID NO: 80 y 79 respectivamente. 1B4 es un anticuerpo anti-CEA con HC SEQ ID NO: 43 y LC lambda SEQ ID NO: 74, codificado por las secuencias de ácido nucleico mostradas en las SEQ ID NO: 80 y 77 respectivamente. C11 es un anticuerpo anti-CEA con HC SEQ ID NO: 43 y LC kappa SEQ ID NO: 73, codificado por las secuencias de ácido nucleico mostradas en las SEQ ID NO: 80 y 76 respectivamente.
- 60 Una cadena ligera CEA útil como cadena ligera kappa es de SEQ ID NO: 40. Una cadena ligera CEA útil como cadena ligera kappa es de SEQ ID NO: 73. Una cadena ligera CEA útil como cadena ligera lambda es de SEQ ID NO: 74. Una cadena ligera CEA útil como cadena ligera kappa híbrida es de SEQ ID NO: 75.
- 65 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende en cada subunidad del dominio Fc sustituciones de aminoácido que reducen la unión a un receptor Fc activador y/o la función efectora, en donde dichas sustituciones de aminoácido son L234A, L235A y una sustitución de P329, seleccionada a partir del grupo que consiste en P329A, P329G y P329R (numeración del índice de Kabat EU). En una realización, la cadena pesada común del anticuerpo según la invención es de SEQ ID NO: 43, 44 o 45. En una realización, la cadena pesada común del anticuerpo según la invención es de SEQ ID NO: 45 (L234A, L235A y P329A).

En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra una o más propiedades seleccionadas a partir del grupo de a) unión a células MKN-45 con un valor de EC50 de 0,5 nM a 50 nM, b1) competencia con un anticuerpo anti-CEA, que comprende como dominios VL y VH VL y VH de secuencias SEQ ID NO: 48 y 49 (MEDI)

5 c) comprendiendo en cada subunidad del dominio Fc sustituciones de aminoácido que reducen la unión a un receptor Fc activador y/o la función efectora, en donde dichas sustituciones de aminoácido son L234A y L235A y una sustitución de P329, seleccionada a partir del grupo que consiste en P329A, P329G y P329R (numeración de índice Kabat EU), d) destrucción de células MKN-45, HPAF-II y/o LS174T en un ensayo que contiene PBMC humana de manera dependiente de la concentración con un valor de EC50 de 0,01 a 10 nM.

10 En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra una o más propiedades seleccionadas a partir del grupo de

15 a) unión a células MKN-45 con un valor de EC50 de 0,5 nM a 50 nM,

20 b) destrucción de células MKN-45, HPAF-II o LS174T en un ensayo que contiene PBMC humano de manera dependiente de la concentración con un valor de EC50 de 0,01 a 10 nM,

25 c) unión a células PEAK que expresan CEACAM5, pero que no presentan reactividad cruzada con células PEAK que expresan CEACAM8,

30 d) la EC50 de destrucción en el ensayo TDCC (Ejemplo 8) cuando se utilizan células tumorales LS174T como células diana no aumenta en más de un factor 5 en presencia de 1 µg/mL de sCSEA,

35 e) inhibición del crecimiento tumoral en un modelo HPAF-II en un 25 % o más en comparación con el grupo de control (solo vehículo),

40 f) competición con un anticuerpo anti-CEA, que comprende como dominios VL y VH VL y VH de secuencias SEQ ID NO: 48 y 49 (MEDI), y

45 g) comprendiendo en cada subunidad del dominio Fc sustituciones de aminoácido L234A, L235A y P329A (numeración del índice Kabat EU).

50 En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra las propiedades de a) a d). En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra las propiedades de a) a f). En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra las propiedades de a) a d) y f) y g). En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra las propiedades de a) a g).

55 En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende

60 En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión,

65 que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3ε humano, caracterizado por que

70 a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común (cHC) y comprenden como región variable una región variable que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,

75 b) la primera parte de unión comprende

80 i) una región constante de cadena ligera kappa (CL), y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 una CDRL1 de SEQ ID NO: 32, una CDRL2 de SEQ ID NO: 33 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 34 o una región variable de cadena ligera derivada de SEQ ID NO: 31 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados,

85 c) la segunda parte de unión comprende una región variable de cadena ligera, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un grupo de CDR seleccionados a partir del grupo que consiste en

90 1. I) CDRL1 de SEQ ID NO: 6, una CDRL2 de SEQ ID NO: 7 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 8,

95 2. II) CDRL1 de SEQ ID NO: 10, una CDRL2 de SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 12,

100 3. III) CDRL1 de SEQ ID NO: 14, una CDRL2 de SEQ ID NO: 15 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 16,

4. IV) CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20, y
 5. V) CDRL1 de SEQ ID NO: 22, una CDRL2 de SEQ ID NO: 23 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 24.

5 d) la segunda parte de unión comprende una región constante de cadena ligera lambda.

En una realización, la segunda parte de unión en c) comprende una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 y 29

10 En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3 ϵ humano, caracterizado por que

15 a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,

20 b) la primera parte de unión comprende una región variable de cadena ligera (VL), que comprende como CDR una CDRL1 derivado de la SEQ ID NO: 32 por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados y que comprende hasta cuatro sustituciones de aminoácido, una CDRL2 derivado de SEQ ID NO: 33 por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados y que comprende hasta cuatro sustituciones de aminoácido, una CDRL3 derivado de SEQ ID NO: 34 por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados y que comprende hasta cuatro sustituciones de aminoácido,

25 c) la segunda parte de unión comprende una región variable de cadena ligera, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 una CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20.

30 Tales anticuerpos biespecíficos son, entre otros, anticuerpos biespecíficos anti CEAxCD3 AB13L3-1, AB14L3-1, AB15L3-1, AB17L3-1, AB20L3-1, AB54L3-1, AB60L3-1, AB66L3-1, AB71L3-1, AB72L3-1 y AB73L3-1.

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3 ϵ humano, caracterizado por que:

35 a) la primera parte de unión comprende una región variable de cadena pesada VH, que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,

40 b) la primera parte de unión comprende como región variable de cadena ligera una región variable de cadena ligera que comprende un conjunto de CDRL seleccionado del grupo que consiste en

45 b1) una CDRL1 de SEQ ID NO: 32, CDRL2 de SEQ ID NO: 33, y CDRL3 de SEQ ID NO: 34,

b2) una CDRL1 de SEQ ID NO: 81, CDRL2 de SEQ ID NO: 82, y CDRL3 de SEQ ID NO: 83,

b3) una CDRL1 de SEQ ID NO: 84, CDRL2 de SEQ ID NO: 85, y CDRL3 de SEQ ID NO: 86,

50 b4) una CDRL1 de SEQ ID NO: 87, CDRL2 de SEQ ID NO: 88, y CDRL3 de SEQ ID NO: 89,

b5) una CDRL1 de SEQ ID NO: 93, CDRL2 de SEQ ID NO: 94, y CDRL3 de SEQ ID NO: 95, y

55 c) la segunda parte de unión comprende una región variable de cadena pesada VH que comprende una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y CDRH3 de SEQ ID NO: 4 o una región variable de cadena ligera VL que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 18, CDRL2 de SEQ ID NO: 19, y CDRL3 de SEQ ID NO: 20.

60 En una realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por comprender una primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3 ϵ humano, caracterizada por que:

65 a) la primera parte de unión comprende una región variable de cadena pesada VH, que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,

b) la primera parte de unión comprende como región variable de cadena ligera una región variable de cadena ligera que comprende un conjunto de CDRL seleccionado del grupo que consiste en

- 5 b1) una CDRL1 de SEQ ID NO: 90, CDRL2 de SEQ ID NO: 91, y CDRL3 de SEQ ID NO: 92,
 b2) una CDRL1 de SEQ ID NO: 96, CDRL2 de SEQ ID NO: 97, y CDRL3 de SEQ ID NO: 98,
 10 b3) una CDRL1 de SEQ ID NO: 99, CDRL2 de SEQ ID NO: 100, y CDRL3 de SEQ ID NO: 101,
 b4) una CDRL1 de SEQ ID NO: 102, CDRL2 de SEQ ID NO: 103, y CDRL3 de SEQ ID NO: 104,
 b5) una CDRL1 de SEQ ID NO: 105, CDRL2 de SEQ ID NO: 106, y CDRL3 de SEQ ID NO: 107, y
 15 b6) una CDRL1 de SEQ ID NO: 111, CDRL2 de SEQ ID NO: 112, y CDRL3 de SEQ ID NO: 113, y
 c) la segunda parte de unión comprende una región variable de cadena pesada VH que comprende una CDRH1 de
 SEQ ID NO: 2, CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y CDRH3 de SEQ ID NO: 4 o una región variable de cadena ligera VL
 que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 18, CDRL2 de SEQ ID NO: 19, y CDRL3 de SEQ ID NO: 20.

20 En una realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por comprender una primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3ε humano, caracterizada por que:

- 25 a) la primera parte de unión comprende una región variable de cadena pesada VH, que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,
 b) la primera parte de unión comprende como región variable de cadena ligera una región variable de cadena ligera que comprende un conjunto de CDRL seleccionado del grupo que consiste en
 30 b1) una CDRL1 de SEQ ID NO: 90, CDRL2 de SEQ ID NO: 91, y CDRL3 de SEQ ID NO: 92,
 b2) una CDRL1 de SEQ ID NO: 105, CDRL2 de SEQ ID NO: 106, y CDRL3 de SEQ ID NO: 107, y
 35 b3) una CDRL1 de SEQ ID NO: 111, CDRL2 de SEQ ID NO: 112, y CDRL3 de SEQ ID NO: 113, y
 c) la segunda parte de unión comprende una región variable de cadena pesada VH que comprende una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y CDRH3 de SEQ ID NO: 4 o una región variable de cadena ligera VL
 que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 18, CDRL2 de SEQ ID NO: 19, y CDRL3 de SEQ ID NO: 20.

40 En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende

- 45 a) en la primera parte de unión una región variable de cadena pesada VH que tiene 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de
 identidad de aminoácido con la SEQ ID NO: 1, que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 2, una CDR2 de SEQ
 ID NO: 3 y una CDR3 de SEQ ID NO: 4, y
 b) una región variable de cadena ligera VL seleccionada a partir del grupo que consiste en
 50 b1) una región variable de cadena ligera VL que tiene 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de
 aminoácido con la SEQ ID NO: 31 y que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 32, CDRL2 de SEQ
 ID NO: 33, y CDRL3 de SEQ ID NO: 34,
 b2) una región variable de cadena ligera VL que tiene 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de
 aminoácido con la SEQ ID NO: 114 y que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 81, CDRL2 de SEQ
 ID NO: 82, y CDRL3 de SEQ ID NO: 83,
 55 b3) una región variable de cadena ligera VL que tiene 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de
 aminoácido con la SEQ ID NO: 115 y una CDRL1 de SEQ ID NO: 84, CDRL2 de SEQ ID NO: 85, y
 CDRL3 de SEQ ID NO: 86,
 60 b4) una región variable de cadena ligera VL que tiene 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de
 aminoácido con la SEQ ID NO: 116 y una CDRL1 de SEQ ID NO: 87, CDRL2 de SEQ ID NO: 88, y
 CDRL3 de SEQ ID NO: 89,
 65 c) la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH que tiene 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de
 identidad de aminoácido con la SEQ ID NO: 1, que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 2, una CDR2 de SEQ

ID NO: 3 y una CDR3 de SEQ ID NO: 4, una región variable de cadena ligera VL que tiene 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de aminoácido con la SEQ ID NO: 17, que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 18, CDRL2 de SEQ ID NO: 19, y CDRL3 de SEQ ID NO: 20.

5 En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende

a) en la primera parte de unión una región variable de cadena pesada VH SEQ ID NO: 1, y

b) una región variable de cadena ligera VL seleccionada a partir del grupo que consiste en

10 b1) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 31,

b2) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 114,

15 b3) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 115,

b4) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 116,

20 b5) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 118,

b6) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 119,

c) en la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 17.

25

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico según la invención, caracterizado por que comprende

30 a) en la primera parte de unión una región variable de cadena pesada VH SEQ ID NO: 1, y

b) una región variable de cadena ligera VL seleccionada a partir del grupo que consiste en

35 b1) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 117,

b2) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 119,

b3) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 120,

40 b4) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 121,

b5) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 122, y

b6) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 124, y

45

b7) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 123, y -

c) en la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 17.

50

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico según la invención, caracterizado por que comprende

a) en la primera parte de unión una región variable de cadena pesada VH SEQ ID NO: 1, y

55

b) una región variable de cadena ligera VL seleccionada a partir del grupo que consiste en

b1) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 117,

60 b2) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 122, y

b3) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 124, y

c) en la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 17.

65

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión,

a) una región variable de cadena pesada VH SEQ ID NO: 1, y

5 b) una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en

b1) la cadena ligera de SEQ ID NO: 40

b2) la cadena ligera de SEQ ID NO: 125,

10 b3) la cadena ligera de SEQ ID NO: 126,

b4) la cadena ligera de SEQ ID NO: 127,

15 b5) la cadena ligera de SEQ NO:129, y en la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ IDNO:1 y una cadena ligera de SEQ ID NO:28. En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico, que comprende en la primera parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO:1 y b) una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en

20 b5) la cadena ligera de SEQ ID NO: 128,

b2) la cadena ligera de SEQ ID NO: 129,

25 b3) la cadena ligera de SEQ ID NO: 130,

b4) la cadena ligera de SEQ ID NO: 131

b5) la cadena ligera de SEQ ID NO: 132,

30 b6) la cadena ligera de SEQ ID NO: 133, y

b7) la cadena ligera de SEQ ID NO: 134, y

35 b8) la cadena ligera de SEQ ID NO: 135, y

35 c) en la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 28.

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende en la primera parte de unión,

40 a) una cadena pesada común seleccionada a partir del grupo que consiste en

a1) la cadena pesada de SEQ ID NO: 43,

45 a2) la cadena pesada de SEQ ID NO: 44, o

a3) la cadena pesada de SEQ ID NO: 45, y

50 b) una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en

b1) la cadena ligera de SEQ ID NO: 128,

b2) la cadena ligera de SEQ ID NO: 130,

55 b3) la cadena ligera de SEQ ID NO: 131,

b4) la cadena ligera de SEQ ID NO: 132,

60 b5) la cadena ligera de SEQ ID NO: 133

b6) la cadena ligera de SEQ ID NO: 134, o

b7) la cadena ligera de SEQ ID NO: 135, y

65 c) en la segunda parte de unión una cadena ligera de SEQ ID NO: 28.

- En una realización, un anticuerpo biespecífico según la invención (AB17L3-1/N) comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45 (/N) y en la segunda parte de unión como cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 28 (1A4 LC respectivamente L3-1) y en la segunda parte de unión como una cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 128 (AB17). En una realización, un anticuerpo biespecífico según la invención (AB71L3-1/N) comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45 (/N) y en la segunda parte de unión como cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 28 (L3-1) y en la segunda parte de unión como cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 133 (AB71). En una realización, un anticuerpo biespecífico según la invención (AB73L3-1/N) comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45 (/N) y en la segunda parte de unión como cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 28 (L3-1) y en la segunda parte de unión como cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 135 (AB73).
- En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3 ϵ humano, y
- a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común y comprenden como región variable una región variable que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,
- b) la primera parte de unión comprende
- i) una región constante de cadena ligera lambda (CL) y
 - ii) una región variable de cadena ligera (VL), que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 una CDRL1 de SEQ ID NO: 36, una CDRL2 de SEQ ID NO: 37 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 38 o una región variable de cadena ligera derivada de SEQ ID NO: 35 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados,
- c) la segunda parte de unión comprende una región variable de cadena ligera, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un grupo de CDR seleccionados a partir del grupo que consiste en
1. I) CDRL1 de SEQ ID NO: 6, una CDRL2 de SEQ ID NO: 7 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 8,
 2. II) CDRL1 de SEQ ID NO: 10, una CDRL2 de SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 12,
 3. III) CDRL1 de SEQ ID NO: 14, una CDRL2 de SEQ ID NO: 15 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 16,
 4. IV) CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20, y
 5. V) CDRL1 de SEQ ID NO: 22, una CDRL2 de SEQ ID NO: 23 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 24. d) la segunda parte de unión comprende una región constante de cadena kappa híbrida.
- En una realización, la segunda parte de unión en c) comprende una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70 y 71.
- En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, una segunda parte de unión comprende como región constante de cadena ligera una región constante de cadena ligera lambda de SEQ ID NO: 41; en ese caso, en una realización, la primera parte de unión comprende como región constante de cadena ligera una región de cadena ligera kappa híbrida de SEQ ID NO: 58.
- En un aspecto, la rama que porta la región constante de cadena ligera híbrida se basa en las propiedades generales de bsAb, incluyendo, entre otras, estabilidad y productividad.
- En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, la región variable de cadena ligera de la primera parte de unión se deriva de SEQ ID NO: 35 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados, la cadena pesada común es de SEQ ID NO: 45 y la región variable de la cadena pesada común es de SEQ ID NO: 1.
- En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión que se une específicamente a CEACAM5 humano y una segunda parte de unión que se une específicamente a CD3 ϵ humano, y
- a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común y comprenden como región variable una región variable que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,

b) la primera parte de unión comprende

- i) una región constante de cadena ligera kappa (CL) y
- ii) una región variable de cadena ligera (VL), que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 una CDRL1 de SEQ ID NO: 64, una CDRL2 de SEQ ID NO: 65 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 66 o una región variable de cadena ligera derivada de SEQ ID NO: 63 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos,

10 c) la segunda parte de unión comprende una región variable de cadena ligera, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un grupo de CDR seleccionados a partir del grupo que consiste en

1. I) CDRL1 de SEQ ID NO: 6, una CDRL2 de SEQ ID NO: 7 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 8,
2. II) CDRL1 de SEQ ID NO: 10, una CDRL2 de SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 12,
3. III) CDRL1 de SEQ ID NO: 14, una CDRL2 de SEQ ID NO: 15 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 16,
4. IV) CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20, y
5. V) CDRL1 de SEQ ID NO: 22, una CDRL2 de SEQ ID NO: 23 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 24.

d) la segunda parte de unión comprende una región constante de cadena ligera lambda.

25 En una realización, la segunda parte de unión en c) comprende una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 y 29.

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, la región variable de cadena ligera de la primera parte de unión se deriva de SEQ ID NO: 63 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados, la cadena pesada común es de SEQ ID NO: 45.

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión,

que se une específicamente a CEACAM5 humano y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3ε humano, y

- a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común y comprenden como región variable una región variable que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,
- b) la primera parte de unión una región constante de cadena ligera lambda (CL), y una región variable de cadena ligera (VL), que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 una CDRL1 de SEQ ID NO: 60, una CDRL2 de SEQ ID NO: 61 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 62 o una región variable de cadena ligera derivada de SEQ ID NO: 59 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados,
- c) la segunda parte de unión comprende una región variable de cadena ligera, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un grupo de CDR seleccionados a partir del grupo que consiste en

1. I) CDRL1 de SEQ ID NO: 6, una CDRL2 de SEQ ID NO: 7 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 8,
2. II) CDRL1 de SEQ ID NO: 10, una CDRL2 de SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 12,
3. III) CDRL1 de SEQ ID NO: 14, una CDRL2 de SEQ ID NO: 15 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 16,
4. IV) CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20, y
5. V) CDRL1 de SEQ ID NO: 22, una CDRL2 de SEQ ID NO: 23 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 24.

d) la segunda parte de unión comprende una región constante de cadena kappa híbrida.

60 En otro aspecto ajeno a las reivindicaciones, la segunda parte de unión comprende como región constante de cadena ligera una región constante de cadena ligera lambda de SEQ ID NO: 41; en ese caso, en una realización, la primera parte de unión comprende como región constante de cadena ligera una región constante de cadena ligera kappa híbrida de SEQ ID NO: 58. La elección de la rama que porta la región constante de cadena ligera híbrida se basa en las propiedades generales de bsAb final, incluyendo, entre otras, estabilidad y productividad.

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, la región variable de cadena ligera de la primera parte de unión se deriva de SEQ ID NO: 59 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados.

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión,

5

que se une específicamente a CEACAM5 humano y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3 ϵ humano, y

- 10 a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común y comprenden como región variable una región variable que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,
- 15 b) la primera parte de unión comprende una región constante de cadena ligera de tipo kappa humano y una región variable de cadena ligera de tipo kappa humano, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 una CDRL1 de SEQ ID NO: 32 con sustitución de 0, 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, una CDRL2 de SEQ ID NO: 33 con sustitución de 0, 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, y una CDRL3 de SEQ ID NO: 34 con sustitución de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos,
- 20 c) la segunda parte de unión comprende una región constante de cadena ligera de tipo lambda humano y una región variable de cadena ligera de tipo lambda humano, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un grupo de CDR seleccionado del grupo que consiste en
- 25 1. I) CDRL1 de SEQ ID NO: 6, una CDRL2 de SEQ ID NO: 7 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 8,
- 30 2. II) CDRL1 de SEQ ID NO: 10, una CDRL2 de SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 12,
- 35 3. III) CDRL1 de SEQ ID NO: 14, una CDRL2 de SEQ ID NO: 15 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 16,
- 40 4. IV) CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20, y
- 45 5. V) CDRL1 de SEQ ID NO: 22, una CDRL2 de SEQ ID NO: 23 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 24.

En tal caso, la segunda parte de unión en c) comprende una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 y 29.

35 En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión,

que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3 ϵ humano, y

- 40 a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común y comprenden como región variable una región variable que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,
- 45 b) la primera parte de unión comprende una región constante de cadena ligera de tipo lambda humano y una región variable de cadena ligera de tipo lambda humano, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un conjunto de CDRL seleccionado del grupo que consiste en una CDRL1 de SEQ ID NO: 36 con sustitución de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, una CDRL2 de SEQ ID NO: 37 con sustitución de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, y una CDRL3 de SEQ ID NO: 38 con sustitución de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos,
- 50 c) la segunda parte de unión comprende una región constante de cadena ligera kappa híbrida y una región variable de cadena ligera de tipo lambda humano, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un grupo de CDR seleccionado del grupo que consiste en
- 55 1. I) CDRL1 de SEQ ID NO: 6, una CDRL2 de SEQ ID NO: 7 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 8,
- 60 2. II) CDRL1 de SEQ ID NO: 10, una CDRL2 de SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 12,
- 65 3. III) CDRL1 de SEQ ID NO: 14, una CDRL2 de SEQ ID NO: 15 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 16,
- 70 4. IV) CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20, y
- 75 5. V) CDRL1 de SEQ ID NO: 22, una CDRL2 de SEQ ID NO: 23 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 24.

En tal caso, la segunda parte de unión en c) comprende una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70 y 71.

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3 ϵ humano, y

5 a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común y comprenden como región variable una región variable que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,

10 b) la primera parte de unión comprende una región constante de cadena ligera de tipo lambda humano y una región variable de cadena ligera de tipo lambda humano, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un conjunto de CDRL seleccionado del grupo que consiste en una CDRL1 de SEQ ID NO: 60 con sustitución de 0, 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, una CDRL2 de SEQ ID NO: 61 con sustitución de 0, 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, y una CDRL3 de SEQ ID NO: 62 con sustitución de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, y

15 c) la segunda parte de unión comprende una región constante de cadena ligera de tipo kappa humano y una región variable de cadena ligera de tipo lambda humano, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un grupo de CDR seleccionado del grupo que consiste en

20 1. I) CDRL1 de SEQ ID NO: 6, una CDRL2 de SEQ ID NO: 7 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 8,

2. II) CDRL1 de SEQ ID NO: 10, una CDRL2 de SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 12,

3. III) CDRL1 de SEQ ID NO: 14, una CDRL2 de SEQ ID NO: 15 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 16,

25 4. IV) CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20, y

5. V) CDRL1 de SEQ ID NO: 22, una CDRL2 de SEQ ID NO: 23 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 24.

30 En tal caso, la segunda parte de unión en c) comprende una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70 y 71.

En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera parte de unión que se une específicamente a CEACAM5 humano y una segunda parte de unión que se une específicamente a CD3 ϵ humano, y

35 a) la primera parte de unión y la segunda parte de unión comprenden en cada caso como cadena pesada una cadena pesada común y comprenden como región variable una región variable que comprende como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,

40 b) la primera parte de unión comprende una región constante de cadena ligera de tipo kappa humano y una región variable de cadena ligera de tipo kappa humano, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un conjunto de CDRL seleccionado del grupo que consiste en una CDRL1 de SEQ ID NO: 64 con sustitución de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, una CDRL2 de SEQ ID NO: 65 con sustitución de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, y una CDRL3 de SEQ ID NO: 66, y con sustitución de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos,

45 c) la segunda parte de unión comprende una región constante de cadena ligera de tipo lambda humano y una región variable de cadena ligera de tipo lambda humano, que comprende como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 un grupo de CDR seleccionado del grupo que consiste en I) CDRL1 SEQ ID NO: 6, una CDRL2 de SEQ ID NO: 7 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 8,

50 II) CDRL1 de SEQ ID NO: 10, una CDRL2 de SEQ ID NO: 11 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 12,

III) CDRL1 de SEQ ID NO: 14, una CDRL2 de SEQ ID NO: 15 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 16,

55 IV) CDRL1 de SEQ ID NO: 18, una CDRL2 de SEQ ID NO: 19 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 20, y

V) CDRL1 de SEQ ID NO: 22, una CDRL2 de SEQ ID NO: 23 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 24.

60 En tal caso, la segunda parte de unión en c) comprende una cadena ligera seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 y 29.

En una realización, la primera parte de unión comprende como secuencia marco de cadena ligera variable la secuencia marco de SEQ ID NO: 31. En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, una primera parte de unión comprende como secuencia marco de cadena ligera variable la secuencia marco de SEQ ID NO: 35. En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, una primera parte de unión comprende como secuencia marco de cadena ligera variable la secuencia

marco de SEQ ID NO: 59. En un aspecto ajeno a las reivindicaciones, una primera parte de unión comprende como secuencia marco de cadena ligera variable la secuencia marco de SEQ ID NO: 63.

- 5 En una realización, la primera parte de unión que se une específicamente a CEA comprende como región variable de cadena pesada una región variable de cadena pesada de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y como región variable de cadena ligera una región variable de cadena ligera de una secuencia de aminoácidos que es 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 63, y la segunda parte de unión que se une específicamente a CD3 comprende como región variable de cadena pesada una región variable de cadena pesada de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y como región variable de cadena ligera una región variable de cadena ligera de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 21.

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende

- 15 una primera parte de unión específica para CEA, que comprende un dominio variable de cadena ligera kappa y un dominio constante de cadena ligera kappa y una segunda parte de unión específica para CD3 ϵ , que comprende un dominio variable de cadena ligera lambda y un dominio constante de cadena ligera lambda.

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende

- 20 una primera parte de unión específica para CEA, que comprende un dominio variable de cadena ligera lambda y un dominio constante de cadena ligera kappa y una segunda parte de unión específica para CD3 ϵ , que comprende un dominio variable de cadena ligera lambda y un dominio constante de cadena ligera lambda.

- 25 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende

una primera parte de unión específica para CEA, que comprende un dominio variable de cadena ligera lambda y un dominio constante de cadena ligera lambda y una segunda parte de unión específica para CD3 ϵ , que comprende un dominio variable de cadena ligera lambda y un dominio constante de cadena ligera kappa.

- 30 En una realización, el dominio Fc exhibe una afinidad de unión reducida a un receptor Fc y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc IgG1 nativo/ de tipo nativo. En una realización, el dominio Fc está diseñado para tener afinidad de unión reducida a un receptor Fc y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc no diseñado. En una realización, el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a uno o más receptores Fc y/o reducen la función efectora. En una realización, tal sustitución o tales sustituciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidratos Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435 (Shields, R. L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434). En una realización, el anticuerpo se refiere a la unión a FcR de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265 y/o contiene la mutación PVA236. En una realización, las mutaciones en el dominio Fc son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236. En otra realización, las mutaciones en el dominio Fc son en IgG4 S228P y en IgG1 L234A y L235A. En una realización, la una o más sustituciones de aminoácido en el dominio Fc que reduce la unión a uno o más receptores Fc y/o reduce funciones efectoras es en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329 (numeración del índice de Kabat EU). En realizaciones, cada subunidad del dominio Fc comprende dos sustituciones de aminoácido que reducen la unión a un receptor Fc y/o reduce la función efectora, en donde dichas sustituciones de aminoácido son L234A y L235A (numeración del índice de Kabat EU). En realizaciones, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácido que reducen la unión a un receptor Fc y/o reduce la función efectora, en donde dichas sustituciones de aminoácido son L234A, L235A y P329A (numeración del índice de Kabat EU). En tal realización, el dominio Fc es un dominio IgG1Fc, particularmente un dominio IgG1Fc humano (numeración del índice de Kabat EU). En una realización, el dominio Fc es de subclase IgG4 y en una realización es de subclase IgG4 con mutación S228P.

- 55 En una realización, el receptor Fc es un receptor Fc γ . En una realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En una realización, el receptor Fc es un receptor Fc activador. En una realización, el receptor Fc es Fc γ RIIIA, Fc γ RI y/o Fc γ RIIIA humano. En una realización, la función efectora es citotoxicidad (ADCC) mediada por células dependiente de anticuerpos, pero no se limita únicamente a ADCC.

- 60 En una realización, una región CL kappa es de SEQ ID NO: 58 se utiliza en la segunda parte de unión como región CL en la construcción de un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 43, 44 o 45 y una región CL lambda de SEQ ID NO: 41 como región CL en la primera parte de unión.

- 65 En una realización, una región CL kappa es de SEQ ID NO: 58 se utiliza en la segunda parte de unión, que se une específicamente a CL3 como región CL en la construcción de un anticuerpo biespecífico, que comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 43, 44 o 45 y una región CL lambda de SEQ ID NO: 41 como región CL en la primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5.

- En una realización, una región CL kappa es de SEQ ID NO: 58 se utiliza en la segunda parte de unión, que se une específicamente a CL3 como región CL en la construcción de un anticuerpo biespecífico, que comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 43, 44 o 45 y una cadena ligera variable de SEQ ID NO: 5, 9, 13, 17 o 21 y una región CL lambda de SEQ ID NO: 41 como región CL en la primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5.
- 5 Es útil para una mayor comprensión de la invención un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 76, 77, 78 y 79 se utiliza en la maduración de afinidad de anticuerpos mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados de la respectiva región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 31, 35, 59 y 63.
- 10 En otro aspecto, se proporciona un método de producción del anticuerpo biespecífico de la invención, que comprende los pasos de a) cultivo de la célula huésped de la invención bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo biespecífico y b) recuperación del anticuerpo biespecífico. La invención abarca también un anticuerpo biespecífico producido mediante el método de la invención.
- 15 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo específico de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En la invención también se incluyen métodos de uso del anticuerpo biespecífico y la composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico o una composición farmacéutica de la invención para uso como un medicamento. En un aspecto se proporciona un anticuerpo biespecífico o una composición farmacéutica según la invención para uso en el tratamiento de 20 una enfermedad en un individuo que lo necesita. En una realización específica, la enfermedad es cáncer.
- 25 También se proporciona un anticuerpo biespecífico de la invención para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesita; así como un método de tratamiento de una enfermedad en un individuo que comprende la administración a dicho individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende el anticuerpo biespecífico según la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la enfermedad es cáncer. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el individuo es preferiblemente un mamífero, particularmente un humano.
- 30 Los anticuerpos biespecíficos son útiles en la inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, que comprende la puesta en contacto de una célula diana con un anticuerpo biespecífico de la invención en presencia de una célula T, particularmente una célula T citotóxica.
- 35 Otra realización de la invención es el anticuerpo biespecífico según la invención para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que expresa CEA.
- 40 Otra realización de la invención es el anticuerpo biespecífico según la invención para uso en la fabricación de un medicamento según la invención, caracterizado por que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de esófago, cáncer de unión gástrica/esofágica, cáncer de páncreas y cáncer de mama.
- 45 Otra realización de la invención es un anticuerpo biespecífico según la invención para uso en la combinación simultánea, separada o secuencial con un anticuerpo anti-CD47. En una realización, el anticuerpo anti-CD47 es Magrolimab, ALX148 o TTI-621 y/o TTI-622.
- 50 Tales segundos anticuerpos biespecíficos CEAxCD47 se describen en los documentos de patente PCT/IB2019/054559 y US16/428,359.
- 55 Una realización adicional de la invención es un anticuerpo biespecífico según la invención para uso según la invención, caracterizado por que el anticuerpo biespecífico según la invención y el segundo anticuerpo biespecífico CEAxCD47 se administran a dicho sujeto alternantemente a intervalos de 6 a 15 días, pero no de modo limitado a tales intervalos.
- 60 Otra realización de la invención es un primer anticuerpo biespecífico según la invención, que comprende una primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5 humano y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3 humano según la invención, y un segundo anticuerpo biespecífico CEAxCD47 para uso en el tratamiento de cáncer según la invención, caracterizado por que dicho cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas y cáncer de mama.
- 65 Otra realización de la invención es una composición que comprende un anticuerpo biespecífico según la invención, caracterizado por no competir con dicho segundo anticuerpo biespecífico CEAxCD47 como se definió anteriormente para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que expresa CEA.

- 5 Los anticuerpos biespecíficos son útiles en un método para el tratamiento de un paciente humano diagnosticado de un tumor (cáncer), especialmente un tumor sólido, especialmente un cáncer sólido que expresa CEA, especialmente cáncer colorrectal, cáncer de colorrectal cancer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas y cáncer de mama, que comprende la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo biespecífico según la invención y un segundo anticuerpo biespecífico como se describe en los documentos de patente PCT/IB2019/054559 y US16/428,359, contra CEA y CD47, al paciente humano, comprendiendo el método posteriormente:
- 10 administrar al paciente una dosis de 0,1 a 30 mg/kg, en una realización adicional de 0,5 a 10 mg/kg, en una realización adicional de 1 a 10 mg/kg de dicho segundo anticuerpo anti CEAXCD47, por ejemplo semanalmente durante 4 a 12 semanas,
- 15 administrar al paciente dicho segundo anticuerpo q1, q2w, q3w u opcionalmente q4w,
- 20 después de estas 4 a 12 semanas y después de 2 o 3 o 4 vidas medias de eliminación de dicho anticuerpo anti CEAXCD47 administrar al paciente una dosis de 0,1 a 10 mg/kg de un anticuerpo según la invención,
- 25 administrar al paciente dicho anticuerpo según la invención q1, q2w, q3w u opcionalmente q4w,
- 30 esperar 2 o 3 o 4 vidas medias de eliminación de dicho anticuerpo según la invención y después repetir opcionalmente dicho ciclo de administración de anticuerpos biespecíficos CEA × CD47 seguida de administración de anticuerpo biespecífico CEA × CD3 y opcionalmente repetir de nuevo ese ciclo.
- Este método "alternante" se aplica si el anticuerpo de la invención y el segundo anticuerpo biespecífico son competitivos en cuanto a la unión a CEA.
- 35 En caso de que dicho anticuerpo biespecífico CEA × CD47 y el anticuerpo biespecífico CEA × CD3 según esta invención no sean competitivos, los dos anticuerpos biespecíficos también pueden administrarse de manera ("manera simultánea") que el paciente experimente concentraciones plasmáticas y tisulares terapéuticas efectivas de ambos anticuerpos biespecíficos en paralelo, por ejemplo mediante administración al paciente aproximadamente al mismo tiempo una dosis de 0,1 a 30 mg/kg, en un uso adicional de 0,5 a 10 mg/kg, en un uso adicional de 1 a 10 mg/kg de anticuerpo biespecífico CEA × CD47 y 0,1 a 10 mg/kg de anticuerpo biespecífico CEA × CD3 de esta invención, seguido de una o más de estas administraciones combinadas a una frecuencia de q1w o q2w o q3w u opcionalmente q4w.
- 40 El término "q1w" significa administración una vez por semana; q2w significa administración cada dos semanas, etc.
- Otra realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 Otra realización preferida de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención para uso como medicamento en el tratamiento de trastornos tumorales sólidos que expresan CEA.
- Otra realización preferida de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención para uso como medicamento en el tratamiento de cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas o cáncer de mama.
- 50 Otra realización de la invención es una composición farmacéutica según la invención, caracterizada por que el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas o cáncer de mama.
- 55 Otra realización de la invención es un anticuerpo según la invención para uso en la fabricación de una composición farmacéutica.
- Otra realización de la invención es un anticuerpo según la invención y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable para uso en la fabricación de una composición farmacéutica.
- 60 Otra realización de la invención es un anticuerpo según la invención para uso en la fabricación de un medicamento en el tratamiento de trastornos tumorales sólidos.
- Otra realización de la invención es un anticuerpo según la invención para uso como un en el tratamiento de cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas o cáncer de mama.

5

Los anticuerpos biespecíficos son útiles en un método de inducción de lisis celular de una célula tumoral que comprende la puesta en contacto de la célula tumoral con el anticuerpo biespecífico de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En algunos usos, la célula tumoral es una célula de cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas o cáncer de mama.

10

En uno de los usos, la lisis celular es inducida por citotoxicidad celular dirigida por células T (TDCC).

15

Los anticuerpos biespecíficos son útiles en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa CEA, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo biespecífico de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

20

Los anticuerpos biespecíficos son útiles en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa CEA, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo biespecífico de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en combinación con un anticuerpo biespecífico que se une a CEA humano y CD47 humano. Si el anticuerpo CEAxCD47 y el anticuerpo CEAxCD3 son competitivos, competirán por los receptores de CEA en la superficie de la célula tumoral, y la ocupación del receptor y la eficacia de cada componente de combinación dependen de su afinidad de unión y de sus concentraciones plasmáticas y, por lo tanto, son difíciles de predecir y también variables con el tiempo si las concentraciones de los dos fármacos tienen una vida media de eliminación diferente respectivamente eliminación del organismo. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 y CEAxCD47 competitivos deben administrarse de forma secuencial (alternante). Si los anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 y CEAxCD47 no son competitivos o lo son solo mínimamente, no solo pueden administrarse secuencialmente, sino también en paralelo (simultáneamente), lo que puede ser una ventaja, ya que se espera que la destrucción de células tumorales a través de la participación de células T por el anticuerpo biespecífico CEAxCD3 y al mismo tiempo a través de la participación de macrófagos por el anticuerpo biespecífico CEAxCD47 sea aditiva o incluso sinérgica, lo que significa que la eficacia aumenta si ambos fármacos se administran en paralelo.

25

Los anticuerpos biespecíficos son útiles en un método de aumento de la supervivencia libre de progresión y/o el tiempo de supervivencia general en un sujeto que tiene un cáncer que expresa CEA, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo biespecífico de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En un uso, el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de mama, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer uterino, cáncer de vejiga u otro cáncer que exprese CEA.

30

En ciertos usos de estos métodos, el anticuerpo biespecífico se administra en combinación con quimioterapia o radioterapia. En un uso, el sujeto es un paciente que padece cáncer colorrectal o cáncer de pulmón o cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas o cáncer de mama u otro cáncer que exprese CEA.

35

En ciertos usos de estos métodos, el anticuerpo biespecífico de la invención se administra al paciente en dosis que oscilan entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis únicas o divididas, o por infusión continua. En ciertos usos, el anticuerpo biespecífico de la invención se administra a un paciente en dosis que oscilan entre 1 y 20 mg/kg.

40

Los anticuerpos biespecíficos son útiles en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa CEA, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo biespecífico de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en combinación con un anticuerpo biespecífico contra CEA humano y CD47 humano. En ciertos usos de estos métodos, el anticuerpo biespecífico se administra en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47 en combinación simultánea, separada o secuencial. En ciertos usos de estos métodos, el anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47 se administra en un patrón alternante con un anticuerpo de la invención, con intervalos de 6 a 15 días entre administraciones del anticuerpo de la invención y un anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47. En ciertos usos, el anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47 de la invención se administra al paciente en dosis que oscilan entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis únicas o divididas, o por infusión continua.

45

En ciertos usos de estos métodos, el anticuerpo biespecífico se administra en combinación con un antagonista de eje PD-1 en combinación simultánea, separada o secuencial. En ciertos usos de estos métodos, el anticuerpo biespecífico se administra en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47 y un antagonista de eje PD-1 en combinación simultánea, separada o secuencial. En ciertos usos, el antagonista de eje PD-1 se administra al paciente en dosis que oscilan entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis únicas o divididas, o por infusión continua.

50

Los anticuerpos biespecíficos son útiles en un método de aumento de la supervivencia libre de progresión y/o el tiempo de supervivencia general en un sujeto que tiene un cáncer que expresa CEA de manera anómala, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo biespecífico de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En una realización, el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas o cáncer de mama.

55

En ciertos usos de estos métodos, el anticuerpo biespecífico se administra en combinación con quimioterapia o radioterapia. En un uso, el sujeto es un paciente que con cáncer colorrectal o cáncer de pulmón o cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas o cáncer de mama u otro cáncer que exprese CEA.

- 5 Otra realización de la invención proporciona un anticuerpo biespecífico según la invención para uso en cualquiera de los métodos de tratamiento descritos anteriormente. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas o cáncer de mama.
- 10 Otra realización de la invención proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos biespecíficos divulgados en el presente documento o un dominio de los mismos (por ejemplo una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada) que se une inmunoespecíficamente a CEACAM5 o CD3ε. En ciertos aspectos, se proporcionan polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento. Los polinucleótidos pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican una cadena pesada que comprende los VH o CDR de cadena pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento. Los polinucleótidos pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican una cadena ligera que comprende los VL o CDR de cadena ligera de los anticuerpos descritos en el presente documento.
- 15 Ciertas realizaciones son vectores que comprenden los polinucleótidos aislados divulgados en el presente documento. Algunas otras realizaciones son células que comprenden los polinucleótidos aislados o vectores que codifican los anticuerpos biespecíficos divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula se selecciona del grupo que consiste en Streptomyces, levadura, célula CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, BMT10, célula vegetal, célula de insecto y célula humana en cultivo tisular.
- 20 Ciertas realizaciones son métodos de producción de los anticuerpos divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, el método de producción de un anticuerpo comprende la expresión del anticuerpo utilizando células que comprenden los polinucleótidos aislados o vectores que codifican los anticuerpos biespecíficos divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, el método de producción de un anticuerpo comprende el cultivo de una célula que contiene un polinucleótido aislado o un vector que codifica los anticuerpos biespecíficos divulgados en el presente documento y el aislamiento del anticuerpo expresado en el mismo.
- 25

Descripción de los dibujos

35 Figura 1: agrupamiento de epítopos de los nuevos aislados de CEA utilizados en los anticuerpos biespecíficos kappa/lambda (KL) CEAxCD3 (detalles en el Ejemplo 5c)

40 Para la caracterización de los nuevos anticuerpos de unión a CEA de esta invención se utiliza un inmunoensayo competitivo. Se crea un perfil de bloqueo competitivo contra anticuerpos que se unen a CEACAM5 (CEA) en su totalidad y para los que ya se ha publicado el epítopo de unión. SM3E, MEDI (=MEDI-565), SAR, T84.66, Labetuzumab y CH1A1A son tales anticuerpos, para más detalles de estos anticuerpos y el ensayo, véase el Ejemplo 5c.

45 Fig. 2 Perfil de Agilent de anticuerpos biespecíficos purificados

50 En el Ejemplo 6 se describe la expresión, la purificación y el análisis de los nuevos anticuerpos biespecíficos kappa lambda CEAxCD3. Los anticuerpos biespecíficos purificados se analizan mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Se utiliza el Bioanalizador Agilent 2100, la figura muestra un resultado típico obtenido para los anticuerpos kappa lambda de esta invención AB1 L3-1/D (anticuerpo biespecífico KL CEAxCD3 con una CD3 LC lambda SEQ ID NO: 28 y un CEA LC kappa SEQ ID NO: 40 y HC común SEQ ID NO 44) y L3-1AB8 H-CK5/D (anticuerpo biespecífico híbrido KL CEAxCD3 con una CD3 LC kappa-híbrido SEQ ID NO: 70 y un CEALC lambda SEQ ID NO: 42 y un HC común SEQ ID NO: 44). Y4 L3-1/D es un anticuerpo biespecífico con la misma rama CD3 que AB1 L3-1/D y L3-1AB8 H-CK5/D pero una segunda rama que no se une a CEA, este anticuerpo se utiliza frecuentemente en ensayos farmacológicos como anticuerpo de control.

55 Fig. 3 Unión a células CD3^{POS} Jurkat (y células CD3^{NEG} TIB-153)

60 Unión dependiente de la concentración de los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB1 L3-1/D y L3-1AB8 H-CK5/D a células Jurkat que expresan CD3. Ambos anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. Y4L3-1/D es un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA. La figura de la derecha muestra que no hay unión a la línea celular negativa CD3 TIB-153 incluso a una concentración de 100 nM de anticuerpos biespecíficos.

65

Fig. 4 Unión a células CEA^{POS} MKN-45 (y células CEA^{NEG} MKN-45 hCEA^{KO})

Unión dependiente de la concentración de los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB1 L3-1/D y L3-1AB8 H-CK5/D a células MKN-45 que expresan CEA. Ambos anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. Y4L3-1/D, un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA, no se une a células MKN-45. La figura de la derecha muestra que no hay unión a la línea celular MKN-45 después de knock-out de CEACAM5 incluso a una concentración de 100 nM.

Fig. 5 Unión a células CEA^{POS} LS174T

Unión dependiente de la concentración de los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB1 L3-1/D y L3-1AB8 H-CK5/D a células LS 174T que expresan CEA. Ambos anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. Y4L3-1/D, un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA, no se une a células LS 174T.

Fig. 6 Destrucción de células CEA^{POS} MKN-45 (y células CEA^{NEG} MKN-45 hCEA^{KO})

Destrucción/lisis de células MKN-45 redirigida por células T dependiente de la concentración mediante los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB1 L3-1/D y L3-1AB8 H-CK5/D (ensayo descrito en el Ejemplo 8 a). Ambos anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. Ambos anticuerpos biespecíficos KL muestran la misma potencia de destrucción. Esto es sorprendente/inesperado ya que la unión de AB1 L3-1/D a MKN-45 es mucho más débil que la unión de L3-1AB8 H-CK5/D (véase la Figura 4).

Y4L3-1/D, un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA, muestra una potencia de destrucción/lisis muy baja a concentraciones aproximadamente 100 veces más elevadas.

Figura de la derecha: solo muy baja destrucción/lisis inespecífica de CEA eliminó células MKN-45 mediante los 3 anticuerpos biespecíficos.

Fig. 7 Destrucción de células CEA^{POS} LS-174T

Destrucción/lisis de células LS-174T redirigida por células T dependiente de la concentración mediante los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB1 L3-1/D y L3-1AB8 H-CK5/D (ensayo descrito en el Ejemplo 8 a). Ambos anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. L3-1AB8 H-CK5/D muestra potencia de destrucción más fuerte que AB1 L3-1/D. La unión de L3-1AB8 H-CK5/D a células LS-174T es mucho más potente que la unión de AB1 L3-1/D (véase la Figura 5).

Y4L3-1/D, un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA, muestra solo una potencia de destrucción/lisis muy baja a concentraciones más de 100 veces más elevadas.

Fig. 8 Unión de mAb monoclonal anti CEA 1B4 a diferentes proteínas recombinantes (ELISA). CEA ECD = dominio extracelular de CEA; CEA A3B3 es el dominio A3 B3 de CEA.

Mesotelina MSLN recombinante se utiliza como un control para medir la unión inespecífica (unión no específica para ECD de CEA, o bien dominio A3B3 de CEA).

Fig. 9 Unión de mAb monoclonal anti CEA C11 a diferentes proteínas recombinantes (ELISA). CEA ECD = dominio extracelular de CEA; CEA A3B3 es el dominio A3 B3 de CEA. Mesotelina MSLN recombinante se utiliza como un control para medir la unión inespecífica (unión no específica para ECD de CEA, o bien dominio A3B3 de CEA).

Fig. 10 Unión de anticuerpos de onda 1 de optimización de principios activos a células CD3^{POS} Jurkat (y células CD3^{NEG} TIB-153)

Unión dependiente de la concentración de los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB13L3-1/N, AB14L3-1/N, AB15L3-1/N, AB17L3-1/N y AB20L3-1/N a células HUT-78 que expresan CD3. Todos los anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. AB1L3-1/N es el anticuerpo biespecífico KL parental del que se derivaron los bsAbs mencionados anteriormente mediante optimización de principios activos. Y4L3-1/N es un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA. TCB 2014 corresponde a otro anticuerpo biespecífico de células T CEAXCD3 descrito en el documento de patente US20140242079, que se incluyó como anticuerpo de referencia. IgG1 corresponde a un anticuerpo IgG1 humana que no se une utilizado como control de isotipo. La figura de la derecha muestra que no hay unión a la línea celular negativa CD3 JKT β -del incluso a una concentración de 100 nM de los anticuerpos biespecíficos. El método se describe en el Ejemplo 7b.

Fig. 11 Unión de anticuerpos de onda 1 de optimización de principios activos a células CEA^{POS} MKN-45, células HPAF-II y células LS174T (ATCC® CL-188™) (y células CEA^{NEG} MKN-45 hCEA^{KO})

Unión dependiente de la concentración de los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB13L3-1/N, AB14L3-1/N, AB15L3-1/N, AB17L3-1/N y AB20L3-1/N a células MKN-45 CEA positivas (A); HPAF-II (C) y LS174T (D) MKN-45_hCEA^{KO} CEA negativas (B). Todos los anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. AB1L3-1/N es el anticuerpo biespecífico KL parental del que se derivaron los bsAbs mencionados anteriormente mediante maduración por afinidad. Y4L3-1/N es un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA. TCB 2014 corresponde a otro anticuerpo biespecífico de células T CEAxCD3 descrito en el documento de patente US20140242079, que se incluyó como anticuerpo de referencia. hlgG1 corresponde a un anticuerpo IgG1 humana que no se une utilizado como control de isotipo. La Figura 10B muestra que no hay unión a la línea celular CEA negativa MKN-45_hCEA^{KO} incluso a una concentración de 100 nM de los anticuerpos biespecíficos. La unión de los anticuerpos de esta invención a células MKN-45 y/o HPAF-II a concentración de 100 nM es 40 % o más superior a la unión de TCB2014. El método se describe en el Ejemplo 7a.

Fig. 12 Destrucción de células CEA^{POS} MKN-45, HPAF-II y LS174T (y células CEA^{NEG} MKN-45 hCEA^{KO}) mediante onda 1 de optimización de principios activos

Destrucción/lisis redirigida por células T dependiente de la concentración de células MKN-45 (A); HPAF-II (C) y LS174T (D) CEA positivas o células MKN-45_hCEA^{KO} (B) CEA negativas mediante los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB13L3-1/N, AB14L3-1/N, AB15L3-1/N, AB17L3-1/N y AB20L3-1/N (ensayo descrito en el Ejemplo 8a). Todos los anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. Todos los anticuerpos biespecíficos KL muestran una destrucción mejorada en comparación con el anticuerpo parental AB1L3-1/N, del que se derivaron mediante optimización de principios activos, cuando se utilizaron células CEA positivas (A, C, D), pero solo una destrucción/lisis inespecífica muy baja de células MKN-45 eliminadas por CEA (B). Y4L3-1/N, un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA, muestra una potencia de destrucción/lisis muy baja a las máximas concentraciones probadas. TCB 2014 corresponde a otro anticuerpo biespecífico de células T CEAxCD3 descrito en el documento de patente US20140242079, que se incluyó como anticuerpo de referencia. Las EC50 de los anticuerpos biespecíficos de esta invención son inferiores a las EC50 de TCB2014, lo que demuestra una potencia mejorada para la destrucción de células tumorales. El método se describe en el Ejemplo 8a.

Fig. 13 Unión de anticuerpos de onda 2 de optimización de principios activos a células T primarias CD3^{POS} (CD4+ y CD8+) y células CD3^{NEG} B y monocitos

Unión dependiente de la concentración de anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB54L3-1/N, AB60L3-1/N, AB66L3-1/N, AB71L3-1/N, AB72L3-1/N y AB73L3-1/N a células T primarias CD4+ CD3 positivas (A) y células T primarias CD8+ (B) o a células B CD3 negativas (C) y monocitos (D). Todos los anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3 y se unen de manera similar a las poblaciones de células T CD3 positivas. Y4L3-1/N, un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA, se une igualmente a células T CD3 positivas. TCB 2014 corresponde a otro anticuerpo biespecífico de células T CEAxCD3 descrito en el documento de patente US20140242079, que se incluyó como anticuerpo de referencia. El anticuerpo anti CD47 humano B6H12 (mAb aCD47) se utilizó como control positivo (células T, células B y monocitos expresan CD47). Ab secundario solo corresponde a una condición en la que solo se añadió el anticuerpo de detección a las células y sirve para determinar la señal de fondo (control negativo). Ninguno de los anticuerpos analizados muestran unión a las poblaciones celulares CD3 negativas incluso a una concentración de 200 nM.

Fig. 14 Unión de anticuerpos de onda 2 de optimización de principios activos a células CEA^{POS} MKN-45, células HPAF-II y células LS174T (y células CEA^{NEG} MKN-45 hCEA^{KO})

Unión dependiente de la concentración de los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB54L3-1/N, AB60L3-1/N, AB66L3-1/N, AB71L3-1/N, AB72L3-1/N y AB73L3-1/N a células MKN-45 (A); HPAF-II (C) y LS174T (D) CEA positivas o células MKN-45_hCEA^{KO} (B) CEA negativas. Todos los anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. Y4L3-1/N es un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA. TCB 2014 corresponde a otro anticuerpo biespecífico de células T CEAxCD3 descrito en el documento de patente US20140242079, que se incluyó como anticuerpo de referencia. La Figura 14B muestra que no hay unión a la línea celular CEA negativa MKN-45_hCEA^{KO} incluso a una concentración de 200 nM de los anticuerpos biespecíficos. Para la Figura 14A, los valores de EC50 se presentan en la Tabla 4. La unión de los anticuerpos biespecíficos de esta invención a concentración de 200 nM es 40 % o más superior a la unión de TCB2014.

Fig. 15 Destrucción de células CEA^{POS} MKN-45 HPAF-II y LS174T (y células CEA^{NEG} MKN-45 hCEA^{KO}) mediante onda 2 de optimización de principios activos

5 Destrucción/lisis redirigida por células T dependiente de la concentración de células MKN-45 (A); HPAF-II (C) y LS174T (D) CEA positivas o células MKN-45_hCEA^{KO} (B) CEA negativas mediante los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB54L3-1/N, AB60L3-1/N, AB66L3-1/N, AB71L3-1/N, AB72L3-1/N y AB73L3-1/N (ensayo descrito en el Ejemplo 8a). Todos los anticuerpos biespecíficos KL portan la misma rama CD3. Y4L3-1/N, un anticuerpo biespecífico KL con la misma rama CD3 pero con la segunda rama que no se une a CEA, muestra una potencia de destrucción/lisis muy baja a las máximas concentraciones probadas. TCB 2014 corresponde a otro anticuerpo biespecífico de células T CEAXCD3 descrito en el documento de patente US20140242079, que se incluyó como anticuerpo de referencia. En comparación con este anticuerpo de referencia TCB2014, los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB54L3-1/N, AB60L3-1/N, AB66L3-1/N, AB71L3-1/N, AB72L3-1/N y AB73L3-1/N muestran en su totalidad valores de EC50 más reducidos, o bien una destrucción más potente de células dianas CEA positivas (A, C, D), pero una destrucción/lisis inespecífica equivalentemente reducida de células MKN-45 (B) eliminadas por CEA. Para la Figura 15A, C y D, los valores de EC50 se presentan en la Tabla 5.

10 Fig. 16 Secreción de citocinas después de destrucción mediada por células T de células tumorales MKN45

15 Secreción de perforina (B); Granzima B (C); IFN-γ (D); TNF-α (E); IL-2 (F); IL-6 (G); IL-10 (H) mediada por los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB17L3-1/N, AB72L3-1/N y AB73L3-1/N después de destrucción mediada por células T de células tumorales MKN45 (E:T (PBMC humanas: células tumorales) = 10:1, 48 h de 20 incubación, la lisis específica se muestra en (A). El método se describe en el Ejemplo 8e.

25 Fig. 17 Activación de células T después de destrucción mediada por células T de células tumorales MKN-45

30 Regulación ascendente de células T humanas CD4+ y CD8+ de CD25 (A y B) y CD69 (C y D) mediada por los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB17L3-1/N, AB72L3-1/N y AB73L3-1/N 2 días después de destrucción mediada por células T de células tumorales MKN-45 CEA positivas (destrucción/lisis de células tumorales mostrada en la Fig. 16A).

35 A pesar de que estadísticamente no hay una lisis de células tumorales diferente a 100 nM, una menor activación de células T de anticuerpos de la invención en comparación con TCB2014 sugiere menores efectos secundarios a la misma lisis tumoral, método descrito en el Ejemplo 8c.

40 Fig. 18 Eficacia antitumoral in vivo en el modelo HPAF-II en ratones NOG con transferencia de huPBMC Eficacia antitumoral in vivo de los anticuerpos biespecíficos KL de la invención AB17L3-1/N, AB72L3-1/N y AB73L3-1/N y de TCB2014 (todas las inyecciones únicas de 10 mg/kg) en el modelo de línea celular tumoral HPAF-II en ratones NOG con transferencia de huPBMC. Los ratones se aleatorizaron el día 11 cuando el volumen tumoral promedio era próximo a 150 mm³. Los resultados muestran el promedio y SEM de 8 ratones de volumen tumoral medido mediante calibrador en los diferentes grupos de estudio. No se encontraron diferencias estadísticas entre AB73L3-1/N y TCB2014. El método se describe en el Ejemplo 9a.

Definiciones

45 Los términos se utilizan en el presente documento tal como se utilizan generalmente en la técnica, a menos que se definan de otra forma en lo sucesivo.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "parte de unión a antígeno, parte de unión" se refiere en su sentido más amplio a una parte de un anticuerpo que se une específicamente a un determinante antigenético como CEA, CD47 y CD3.

55 Más específicamente, tal como se utiliza en el presente documento, una parte de unión que se une al antígeno carcinoembrionario humano (CEA, lo mismo que CEACAM5) unido a la membrana o a CD3 se une específicamente a CEA o CD3, más particularmente a CEA o CD3 unido a la superficie celular o a la membrana. Por "unión específica, específico para, unión a" se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas. En algunas realizaciones, el grado de unión de un anticuerpo antidiaria a una proteína no relacionada y no diana es aproximadamente 10 veces, preferiblemente >100 veces menor que la unión del anticuerpo a dicha diana medida, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR), por ejemplo Biacore®, inmunoabsorción enzimática (ELISA) o citometría de flujo (FACS). Las dianas son las proteínas analizadas en el presente documento, por ejemplo CEA, CD47 y CD3ε.

60 "Unión específicamente a CEA, CD3, unión a CEA, CD3" se refiere en una realización a un anticuerpo que es capaz de unirse a las dianas CEA, o bien CD3, con suficiente afinidad para que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico en la redirección de células T a las células tumorales o a través de la unión de CD3, o bien CEA.

65 Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico según la invención se une a un epítopo CD3 que se conserva de diferentes especies, preferiblemente entre humanos y cinomolgos.

- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cadena pesada de anticuerpo" se refiere a una cadena pesada de anticuerpo, que consiste en una región variable (dominio variable) y una región constante (dominio constante) como se define para un anticuerpo de longitud completa. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cadena ligera de anticuerpo" se refiere a una cadena ligera de anticuerpo, que consiste en una región variable y una región constante como se define para un anticuerpo de longitud completa. Las cadenas ligeras constantes útiles para la presente invención están comprendidas en las cadenas ligeras que se divultan en la presente invención.
- 5 El término "anticuerpo de longitud completa" indica un anticuerpo que consiste en dos "cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa" y dos "cadenas ligeras de anticuerpo de longitud completa". Una "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste en dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 1 (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 2 (CH2) y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 3 (CH3), abreviado como VH-CH1-HR-CH2-CH3. Una "cadena ligera de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste en dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo (CL), abreviado como VL-CL. El dominio constante de cadena ligera (CL) del anticuerpo puede ser κ (kappa) o λ (lambda). Los dos dominios de anticuerpo de longitud completa están unidos entre sí a través de enlaces disulfuro interpolipeptídicos entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagra de las cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa. Son ejemplos de anticuerpos de longitud completa típicos los anticuerpos naturales como IgG (por ejemplo IgG 1 y IgG2), IgM, IgA, IgD y IgE. En una realización, el anticuerpo de longitud completa según la invención es de tipo IgG1 humana, en otra realización comprende una o más sustituciones de aminoácido en la parte Fc como se define más abajo. El anticuerpo de longitud completa según la invención comprende dos partes de unión formadas en cada caso por un par de VH y VL, uniéndose una a CEA y uniéndose la otra a CD3.
- 10 15 20 25
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "región Fc; dominio Fc" se refiere a una región C-terminal de una cadena pesada de IgG; en el caso de un anticuerpo IgG1, la región C-terminal comprende -CH2-CH3 (véase más arriba). Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humano normalmente se define de forma que se extienda desde el residuo de aminoácido de la posición Cys226 hasta el extremo carboxilo terminal.
- 30 35
- Las constantes son bien conocidas en el estado de la técnica y, por ejemplo, se describen por Kabat, E.A., (véase, por ejemplo, Johnson, G., y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785- 2788).
- 40
- El término "epítopo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertos aspectos, los determinantes de epítopos incluyen agrupaciones superficiales de moléculas químicamente activas, como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertos aspectos, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de una diana que se une mediante un anticuerpo.
- 45
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "una cadena pesada común (cHC)" se refiere a un polipéptido que consiste en dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 1 (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 2 (CH2) y un dominio constante de cadena pesada de anticuerpo 3 (CH3), abreviado como VH-CH1-HR-CH2-CH3. Las cadenas pesadas comunes adecuadas para los anticuerpos biespecíficos de la invención son cadenas pesadas como las descritas en los documentos de patente WO2012023053, WO2013088259, WO2014087248, WO2019175658 y WO2016156537.
- 50
- En una realización, la cHC del anticuerpo biespecífico según la invención comprende como cadena pesada CDR una CDRL1 de SEQ ID NO: 2, una CDRL2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 4. En una realización, la cHC del anticuerpo biespecífico según la invención comprende como región variable de cadena pesada una VH de SEQ ID NO: 1. En una realización, la cHC del anticuerpo según la invención es de SEQ ID NO: 43, 44 o 45.
- 55
- El formato de los anticuerpos biespecíficos según la invención y que comprende una cadena pesada común permite la purificación por afinidad de anticuerpos biespecíficos que no se pueden distinguir de una molécula IgG estándar y con características que no se pueden distinguir de un anticuerpo monoclonal estándar (véase, por ejemplo, los documentos de patente WO2013088259, WO2012023053), lo que promete un potencial de inmunogenicidad nulo o reducido en pacientes.
- 60
- Tal como se utiliza en el presente documento, "AB1L3-1, AB17L3-1, AB54L3-1, AB60L3-1, AB66L3-1, AB71L3-1, AB72L3-1, AB73L3-1 y similares" se refieren a anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 según la invención, que comprenden una cadena pesada común que comprende como cadena pesada CDR las CDR de SEQ ID NO: 2, 3 y 4 y que comprenden en la segunda parte de unión como cadena ligera CDR las CDR de SEQ ID NO: 18, 19 y 20. Por lo tanto, AB1, etc., indica
- 65

- una primera parte de unión (parte de unión anti-CEACAM5) y L3-1 indica una segunda parte de unión (parte de unión anti-CD3).
- 5 En una realización, AB1L3-1, AB17L3-1, AB54L3-1, AB60L3-1, AB66L3-1, AB71L3-1, AB72L3-1, AB73L3-1 y similares comprenden una cadena pesada común de SEQ ID NO: 43 (WT hlgG 1) y en la segunda parte de unión como cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 28. Tales anticuerpos biespecíficos se designan en los ejemplos también como AB1L3-1, AB17L3-1, AB71L3-1, AB72L3-1, AB73L3-1.
- 10 En una realización, AB1L3-1, AB17L3-1, AB54L3-1, AB60L3-1, AB66L3-1, AB71L3-1, AB72L3-1, AB73L3-1 y similares comprenden una cadena pesada común de SEQ ID NO: 44 (hlgG1 con mutaciones L234A + L235A) y en la segunda parte de unión como una cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 28 Tales anticuerpos biespecíficos se designan en los ejemplos como AB1L3-1/D, AB17L3-1/D, AB71L3-1/D, AB72L3-1/D, AB73L3-1/D y similares.
- 15 En una realización, AB1L3-1, AB17L3-1, AB54L3-1, AB60L3-1, AB66L3-1, AB71L3-1, AB72L3-1, AB73L3-1 y similares comprenden una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45 (IgG1 con mutaciones L234A+ L235A + P329A) y en la segunda parte de unión como una cadena ligera una cadena ligera de SEQ ID NO: 28 Tales anticuerpos biespecíficos se designan en los ejemplos como AB1L3-1/N, AB17L3-1/N, AB54L3-1/N, AB60L3-1/N, AB66L3-1/N, AB71L3-1/N, AB72L3-1/N, AB73L3-1/N y similares.
- 20 25 Los anticuerpos biespecíficos de la invención, que comprenden una cadena pesada común, se pueden producir, por ejemplo, según el documento de patente WO2012023053. Los métodos descritos en el documento de patente WO2012023053 generan anticuerpos biespecíficos que son idénticos en estructura a una inmunoglobulina humana. Este tipo de molécula está compuesta por dos copias de un único polipéptido de cadena pesada, una primera región variable de cadena ligera fusionada con un dominio constante kappa y una segunda región variable de cadena ligera fusionada con un dominio constante lambda.
- 30 En los anticuerpos biespecíficos de la invención, un sitio de unión muestra especificidad a CEA y el otro sitio muestra especificidad a CD3, en donde contribuyen a cada una la cadena pesada y la cadena ligera respectiva. Las regiones variables de cadena ligera pueden ser de la familia lambda o kappa y están preferentemente fusionadas a dominios constantes lambda y kappa, respectivamente. Esto se prefiere para evitar la generación de uniones polipeptídicas no naturales. Sin embargo, también es posible obtener una rama de anticuerpo utilizable para la generación de anticuerpos específicos de la invención mediante fusión de un dominio variable de cadena ligera kappa con un dominio constante lambda para cualquiera de las dos especificidades o mediante la fusión de un dominio variable de cadena ligera lambda a un dominio constante kappa, también para cualquiera de las dos especificidades. Los anticuerpos biespecíficos descritos en el documento de patente WO 2012023053 son "cuerpos κλ". Este formato de cuerpo κλ permite la purificación por afinidad de un anticuerpo biespecífico que no se puede distinguir de una molécula IgG estándar con características que no se pueden distinguir de un anticuerpo monoclonal estándar y, pro lo tanto, es favorable en comparación con los formatos anteriores, incluyendo, por ejemplo, puentes de aminoácidos u otros elementos no naturales.
- 35 40 Una etapa esencial del método es la identificación de dos regiones Fv del anticuerpo (cada una compuesta por un dominio variable ligero y un dominio variable pesado) que tienen diferentes especificidades de antígeno que comparten el mismo dominio variable de cadena pesada. Se han descrito numerosos métodos para la generación de anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos. (Véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Los anticuerpos totalmente humanos son moléculas de anticuerpo en las que la secuencia tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluidas las CDR 1 y 2, proceden de genes humanos. La región CDR3 puede ser de origen humano o diseñada por medios sintéticos. Dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos" o "anticuerpos totalmente humanos". Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse utilizando la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (véase Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72); y la técnica del hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al., 1985, en: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos y pueden producirse utilizando hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando linfocitos B humanos con el virus de Epstein Barr in vitro (véase Cole, et al., supra).
- 45 50 55 El término "CD3ε or CD3" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a CD3ε humano descrito bajo UniProt P07766 (CD3E _HUMAN). El término "anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti CD3" se refiere a un anticuerpo que se une a CD3ε.
- 60 65 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CEA, CEACAM5" se refiere al antígeno carcinoembrionario humano (CEA, CEACAM-5 o CD66e; UniProtKB - P06731) que es una glucoproteína de la superficie celular y un antígeno asociado a tumores (Gold and Freedman, J Exp. Med., 121:439-462, 1965; Berinstein NL, J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CEACAM6" se refiere a CEACAM6 humano (CD66c; UniProtKB - P40199), que también es miembro de la familia de las moléculas de adhesión a células relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CEACAM1" se refiere a CEACAM1 humano (UniProtKB - P13688 (CEAM1 _HUMAN) que también es miembro de la familia de moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CEACAM8" se refiere a CEACAM8 humano (UniProtKB - P31997 (CEAM8 _HUMAN), que también

es miembro de la familia de las moléculas de adhesión a células relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM). Más información e información sobre otros miembros de la familia CEA se puede encontrar en <http://www.uniprot.org>.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "que se une específicamente a CEA, que se une a CEA, parte de unión a CEA" se refieren en el contexto de los anticuerpos biespecíficos según la invención a especificidad para CEACAM5 en la superficie de una célula. La unión a CEA en células se puede medir con células MKN-45 de adenocarcinoma gástrico que comprenden 100.000 a 400.000 copias de CEA por célula. La concentración del anticuerpo según la invención se varía en un intervalo apropiado con respecto a un valor de CE50 resultante para la unión a células MKN-45 como se ha definido anteriormente. Los anticuerpos biespecíficos según la invención se unen específicamente a tales CEACAM5 unidos a la membrana celular.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CEA humano unido a membrana" se refiere al antígeno carcinoembrionario (CEA) humano que está unido a una porción de membrana de una célula o a la superficie de una célula, en particular, la superficie de una célula tumoral. El término "CEA humano unido a la membrana" puede, en 15 determinadas circunstancias, referirse a CEA que no está unido a la membrana de una célula, pero que se ha construido para preservar el epítopo de CEA unido a la membrana al que se une el anticuerpo según la invención.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sin reactividad cruzada contra CEACAM8" en el contexto de los anticuerpos biespecíficos según la invención se refiere a que la unión del anticuerpo biespecífico según la invención se prueba en células PEAK que expresan CEACAM8 en comparación con la unión a células WT PEAK (para más detalles véanse los Ejemplos 1 y 5) y sin reactividad cruzada significa que la MFI medida para células PEAK que expresan CEACAM8 no es mayor que dos veces la MFI medida para células WT PEAK. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sin reactividad cruzada contra un cierto CEACAM" en el contexto de los anticuerpos específicos 25 según la invención se refiere a dicha reactividad cruzada bajo el mismo procedimiento experimental y la misma definición descrita para CEACAM8.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo biespecífico que se une a CEA humano y a CD3 humano, bsAb CEAxCD3" significa un anticuerpo biespecífico que se une a CEACAM5 humano y CD3ε.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, "región determinante de complementariedad" ("CDR") describe los sitios de combinación de antígenos no contiguos (también conocidos como regiones de unión a antígeno) que se encuentran dentro de la región variable de polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. Las CDR también se denominan "regiones hipervariables" y este término se usa indistintamente en el presente documento con el término "CDR" en referencia a las porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). Kabat et al. también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Tal como se utiliza en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de posiciones específicas de residuos de aminoácidos en el anticuerpo biespecífico según la invención (por ejemplo secuencias CDR), son según el sistema de numeración de Kabat.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mutagénesis dirigida por oligonucleótidos" se refiere a tal método utilizando oligonucleótidos degenerados. Para mutagénesis de cada CDR se utiliza una combinación de varios oligonucleótidos degenerados. Estos comprenden (entre otros) los codones degenerados NNS, HMT, DMT, NHT.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector de expresión" se refiere a uno o más vectores que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo según la invención de una manera apropiada como se conoce del estado de la técnica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula huésped" abarca cualquier tipo de sistema celular que pueda manipularse para generar los anticuerpos biespecíficos de la presente invención. En una realización, la célula huésped se diseña para permitir la producción de una molécula de unión a antígeno.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustitución de aminoácido" se refiere a una sustitución de un aminoácido ajeno al grupo de los 20 aminoácidos estándar proteinogénicos.

Aplicaciones terapéuticas y métodos de utilización de anticuerpos anti-CEAxCD3 según la invención

60 Los anticuerpos antiespecíficos CEACAM x CD3 según la invención están optimizados para el tratamiento de tumores sólidos, ya sea en monoterapia o en terapia combinada, especialmente junto con un anticuerpo anti CD47, un anticuerpo anti-CEAxCD47 y/o un antagonista de eje PD-1. El anticuerpo según la invención y el anticuerpo CD47 o el anticuerpo CEAxCD47 pueden administrarse como se describe a continuación.

La enfermedad, o bien el tumor sólido, es particularmente un cáncer que expresa o incluso sobreexpresa CEA, incluyendo, entre otros, el grupo de tumor colorrectal, tumor de pulmón de células no pequeñas, tumor gástrico, cáncer de esófago, tumor de páncreas y tumor de mama. Particularmente, el tumor es un tumor colorrectal. Todas las aplicaciones terapéuticas, los métodos de uso, los usos,

5

las combinaciones, etc., descritas en el presente documento son especialmente para el tratamiento de estos tumores/estas enfermedades.

10 Los inventores reconocen que los anticuerpos según la invención muestran bajo o nulo potencial de formación de ADA, o bien pérdida de exposición debido a la neutralización de ADA, o bien pérdida de eficacia.

Una realización se relaciona con el uso en un método de tratamiento de carcinomas (cáncer, tumores, por ejemplo carcinomas humanos), especialmente tumores que expresan CEA, *in vivo*. Este método comprende administrar a un 15 sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición que contiene un anticuerpo biespecífico de la invención. Por "sujeto" se entiende un sujeto humano, en una realización un paciente que padece cáncer/tumor/carcinoma.

20 La expresión de CEA en diversas entidades tumorales es generalmente muy elevada, especialmente en carcinoma colorrectal, cáncer de esófago, adenocarcinoma de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer de útero y vejiga entre otros. En los epitelios glandulares sanos y normales del tubo gastrointestinal, el CEA se expresa principalmente en un patrón polarizado en la superficie apical de las células. Este patrón de expresión polarizado limita la accesibilidad de los anticuerpos mono o biespecíficos anti-CEA que se administran por vía sistémica y, por tanto, su posible toxicidad. Este patrón de expresión polarizado se pierde en las células de tumores malignos gastrointestinales. CEA se expresa por igual en toda la superficie celular de las células cancerosas, lo que significa que las células cancerosas son mucho más accesibles a un anticuerpo de la invención que 25 las células sanas normales y pueden ser eliminadas selectivamente por los anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 de la invención, respectivamente por las combinaciones mencionadas anteriormente.

30 En una realización, los anticuerpos biespecíficos de esta invención pueden utilizarse en monoterapia para el tratamiento de tumores sólidos avanzados, en una realización tumores que expresan CEA. En una realización, un anticuerpo específico según la invención se utiliza en combinación con un bsAb CEAxCD47 en combinación simultánea, separada o secuencial. En una realización, un anticuerpo específico según la invención se utiliza en combinación con un bsAb CEAxCD47 y/o antagonista de eje PD-1 en combinación simultánea, separada o secuencial. En una realización, un 35 anticuerpo específico según la invención se utiliza en combinación con un antagonista de eje PD-1 en combinación simultánea, separada o secuencial. Dichos antagonistas del eje PD-1 se describen, por ejemplo, en el documento de patente WO2017118675. Estas combinaciones atacan el cáncer sólido mediante macrófagos y células T. Los anticuerpos CD47 se describen, por ejemplo, en los documentos de patente WO2009091601, WO2009091547, WO2011143624, WO2009131453, WO2013119714, WO2015105995, WO2017181033, WO2018026600, WO2019157432 y WO2013032948 y los anticuerpos biespecíficos contra CEA y CD47 se describen en los documentos de patente PCT/IB2019/054559 y US16/428,539.

40

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "combinación, combinación simultánea, separada o secuencial" de un anticuerpo según la invención y un segundo anticuerpo que se une a CD47 humano o a CEA humano y CD47 humano se refieren a cualquier administración de los dos anticuerpos (o tres anticuerpos en caso de combinación de un anticuerpo de la invención, un mAb CD47 o un bsAb CEAxCD47 y un antagonista de eje PD-1), ya sea por separado o conjuntamente, cuando los dos o tres anticuerpos se administran como parte de un régimen de dosificación apropiado diseñado para obtener el beneficio de la terapia combinada, por ejemplo en la administración separada, secuencial, simultánea, concurrente, cronológicamente escalonada o alternante. Por lo tanto, los dos o tres anticuerpos pueden administrarse como parte de la misma composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. El anticuerpo según la invención se puede administrar antes, al mismo tiempo o después de la administración del segundo anticuerpo biespecífico, o en alguna combinación de los mismos. Cuando el anticuerpo según la invención se administra al paciente a intervalos repetidos, por ejemplo, durante un ciclo estándar de tratamiento, el segundo anticuerpo biespecífico puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de cada administración del anticuerpo de la invención o alguna combinación de los mismos, o a intervalos diferentes en relación con el tratamiento con el anticuerpo de la invención, o en una dosis única antes, en cualquier momento durante o después del ciclo de tratamiento con el anticuerpo de la invención. En una realización, el anticuerpo según la invención y el segundo anticuerpo biespecífico se administran en administración alterna, en una realización en intervalos de 6 a 15 días entre la administración del anticuerpo de la invención y el segundo anticuerpo. En dicha administración alterna, la primera dosis puede ser el anticuerpo de la invención o el segundo anticuerpo.

60

El término "antagonista de eje PD-1" se refiere a un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. Los anticuerpos anti-PD-1 son, por ejemplo, pembrolizumab (Keytruda®, MK-3475), nivolumab, pidilizumab, lambrolizumab, MEDI-0680, PDR001 y REGN2810. Los anticuerpos anti-PD-1 se describen, por ejemplo, en los documentos de patente WO200815671, WO2013173223, WO2015026634, US7521051, US8008449, US8354509, WO20091/14335, WO2015026634, WO2008156712, WO2015026634, WO2003099196, WO2009101611, WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, WO2008/156712 y WO2008/156712. Los anticuerpos anti-PD-L1 son, por ejemplo, atezolizumab, MDX-1 105, durvalumab y avelumab. Los anticuerpos anti-PD-L1 se describen, por ejemplo, en los

documentos de patente WO2015026634, WO2013/019906, WO2010077634, US8383796, WO2010077634, WO2007005874 y WO2016007235.

5 Con respecto a la administración combinada del anticuerpo según la invención y el segundo anticuerpo biespecífico, ambos compuestos pueden estar presentes en una forma de dosificación única o en formas de dosificación separadas, por ejemplo en dos formas de dosificación diferentes o idénticas.

10 Si el anticuerpo de la invención y el segundo anticuerpo no son competitivos con respecto a CEACAM5, en una realización ambos anticuerpos se administran simultáneamente. Si el anticuerpo de la invención y el segundo anticuerpo son competitivos con respecto a CEACAM5, en una realización los anticuerpos se administran simultáneamente.

15 El anticuerpo de la invención normalmente se administrará al paciente en un régimen de dosis que proporcione el tratamiento más eficaz del cáncer (tanto desde el punto de vista de la eficacia como de la seguridad) del que se está tratando al paciente, tal como se conoce en la técnica. Preferiblemente, las células tumorales son atacadas al mismo tiempo por células T y macrófagos, para obtener todo el potencial terapéutico de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 y CEAxCD47 no deben ser competitivos con respecto a la unión a CEA en la superficie celular.

20 Tal como se ha explicado anteriormente, la cantidad de anticuerpo administrada y el momento de la administración del anticuerpo de la invención pueden depender del tipo (por ejemplo, sexo, edad, peso) y la condición general del paciente que se está tratando, la gravedad de la enfermedad o afección que se está tratando y de la vía de administración. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención y el segundo anticuerpo se pueden administrar a un paciente en dosis que varían de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis únicas o divididas, o mediante infusión continua. En una realización, cada uno de los anticuerpos de la invención y el segundo anticuerpo se administra a un paciente en dosis que oscilan entre 1 y 20 mg/kg. En algunos casos, pueden ser adecuados niveles de dosificación por debajo del límite 25 inferior del intervalo mencionado anteriormente, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vida media del anticuerpo" se refiere a la vida media de dicho anticuerpo medida en un ensayo farmacocinético habitual. Un anticuerpo según la invención y el segundo anticuerpo biespecífico contra CEA y CD47 tienen una vida media de eliminación de 3 a 14 días.

35 En otro aspecto, la invención también se dirige al uso del anticuerpo biespecífico según la invención en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de proliferación celular en los que se expresa CEA, particularmente en donde se expresa CEA de manera anómala (por ejemplo sobreexpresado o expresado en un patrón diferente en la superficie celular) en comparación con el tejido normal del mismo tipo celular. Tales trastornos incluyen, entre otros, cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas y cáncer de mama. Los niveles de expresión de CEA pueden determinarse por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, mediante ensayo inmunohistoquímico, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, etc.).

40 En un aspecto, los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden utilizarse para dirigirse a células *in vivo* o *in vitro* que expresan CEA. Los anticuerpos biespecíficos de la invención son particularmente útiles en la prevención de la formación de tumores, la erradicación de tumores y la inhibición del crecimiento de tumores o la metástasis a través de la inducción de TDCC de células tumorales. Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden utilizarse para tratar 45 cualquier tumor que exprese CEA. Las neoplasias malignas particulares que pueden tratarse con los anticuerpos biespecíficos de la invención incluyen, entre otros, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas y cáncer de mama.

50 Los anticuerpos biespecíficos de la invención se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tal como las que se analizan a continuación, incluidas aquellas que se pueden administrar a un ser humano por vía intravenosa en embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Los anticuerpos biespecíficos de la invención también se administran adecuadamente por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para que ejerzan efectos terapéuticos tanto locales como 55 sistémicos.

60 Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpos biespecíficos de la invención dependerá del tipo de enfermedad que hay que tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. El anticuerpo biespecífico de la invención se administra adecuadamente al paciente de una sola vez o durante una serie de tratamientos. La presente invención proporciona un método para la destrucción selectiva de células tumorales que expresan CEA.

65 Este método comprende la interacción de anticuerpos biespecíficos de la invención con dichas células tumorales. Estas células tumorales pueden proceder de un carcinoma humano, como carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma gástrico, cáncer de esófago, carcinoma de páncreas y carcinoma de mama.

En otro aspecto, la invención se dirige a un anticuerpo biespecífico de la invención para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con la expresión anómala de CEA. En una realización particular, la enfermedad es un cáncer que expresa o incluso sobreexpresa CEA, incluyendo, entre otros, tumor colorrectal, tumor de pulmón de células no pequeñas, tumor gástrico, cáncer de esófago, tumor de páncreas y tumor de mama. En 5 una realización particular, el tumor es un tumor colorrectal.

Composiciones, formulaciones, dosificaciones y vías de administración

En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos biespecíficos de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La presente invención se dirige 10 además a tales composiciones farmacéuticas para uso en el método de tratamiento de enfermedades como cáncer, o en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades como cáncer. Específicamente, la presente invención se dirige a un método para el tratamiento de enfermedades, y más particularmente para el tratamiento de cáncer, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica 15 de la invención.

En un aspecto, la presente invención abarca composiciones farmacéuticas, combinaciones y métodos de tratamiento de carcinomas humanos, tumores, como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de carcinomas humanos. 20

Las composiciones de anticuerpos biespecíficos de la invención se pueden administrar utilizando modos de administración convencionales que incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o intratumoral directa. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea. 25

En un aspecto de la invención, las formulaciones terapéuticas que contienen los anticuerpos biespecíficos de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o formulaciones líquidas. Los portadores, excipientes 30 o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. El modo más eficaz de administración y régimen de dosificación para las composiciones farmacéuticas de la presente invención depende de la gravedad y el curso de la enfermedad, la condición general del paciente y la respuesta al tratamiento y el criterio del médico tratante. En consecuencia, las dosis 35 de las composiciones pueden ser dosis fijas o pueden adaptarse al paciente individual, por ejemplo el peso corporal. Sin embargo, una dosis eficaz de las composiciones de esta invención se encontrará generalmente en el intervalo de 0,1 a 20 mg/kg.

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención tienen un peso molecular en una magnitud de 150kD por mol. En 40 una realización, portan una parte Fc. La vida media de eliminación en pacientes se encuentra en el intervalo de 3 a 14 días. Esta vida media permite, entre otras, la administración una vez al día, una vez a la semana o una vez cada dos semanas.

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención y sus respectivas composiciones pueden estar presentes en una diversidad de formas de dosificación que incluyen, pero sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, 45 píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas y soluciones inyectables o infusibles. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

La composición que comprende un anticuerpo biespecífico de la presente invención se formulará, dosificará y administrará 50 de forma consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen la enfermedad o el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa de la enfermedad o del trastorno, el lugar de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

55 Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución intravenosa, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que, en sí misma o en combinación con otra composición, es efectiva para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Un agente activo en la composición es un anticuerpo biespecífico de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo,

en el que la composición comprende un anticuerpo biespecífico de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o terapéutico adicional. Además, el artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender un prospecto que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una condición particular. Alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

5 10 TABLA 1:

LISTA DE SECUENCIAS	
Número de secuencia	Se refiere a
SEQ ID NO: 1	VH común
SEQ ID NO: 2	CDRH1 común
SEQ ID NO: 3	CDRH2 común
SEQ ID NO: 4	CDRH3 común
SEQ ID NO: 5	huCD3 VL 1B6
SEQ ID NO: 6	huCD3 1B6 CDRL1
SEQ ID NO: 7	huCD3 1B6 CDRL2
SEQ ID NO: 8	huCD3 1B6 CDRL3
SEQ ID NO: 9	huCD3 VL 1A10
SEQ ID NO: 10	huCD3 1A10 CDRL1
SEQ ID NO: 11	huCD3 1A10 CDRL2
SEQ ID NO: 12	huCD3 1A10 CDRL3
SEQ ID NO: 13	huCD3 VL 1F8
SEQ ID NO: 14	huCD3 1F8 CDRL1
SEQ ID NO: 15	huCD3 1F8 CDRL2
SEQ ID NO: 16	huCD3 1F8 CDRL3
SEQ ID NO: 17	huCD3 VL 1A4
SEQ ID NO: 18	huCD3 1A4 CDRL1
SEQ ID NO: 19	huCD3 1A4 CDRL2
SEQ ID NO: 20	huCD3 1A4 CDRL3
SEQ ID NO: 21	huCD3 VL 1H4
SEQ ID NO: 22	huCD3 1H4 CDRL1
SEQ ID NO: 23	huCD3 1H4 CDRL2
SEQ ID NO: 24	huCD3 1H4 CDRL3
SEQ ID NO: 25	huCD3 1B6 LC
SEQ ID NO: 26	huCD3 1A10 LC
SEQ ID NO: 27	huCD3 1F8 LC
SEQ ID NO: 28	huCD3 1A4 LC
SEQ ID NO: 29	huCD3 1H4 LC
SEQ ID NO: 30	Cadena pesada constante común (WT IgG1)
SEQ ID NO: 31	CEA VL AB 1 (2F2)
SEQ ID NO: 32	CEA AB1 CDRL1
SEQ ID NO: 33	CEA AB 1 CDRL2
SEQ ID NO: 34	CEAAB1 CDRL3
SEQ ID NO: 35	CEA VL AB8 (2A3)
SEQ ID NO: 36	CEAAB8 CDRL1

LISTA DE SECUENCIAS

Número de secuencia	Se refiere a
SEQ ID NO: 37	CEAAB8 CDRL2
SEQ ID NO: 38	CEAAB8 CDRL3
SEQ ID NO: 39	Región constante de cadena ligera kappa (CK)
SEQ ID NO: 40	Cadena ligera CEAAB 1 (VKCK_2F2)
SEQ ID NO: 41	Región constante de cadena ligera lambda (CL)
SEQ ID NO: 42	Cadena ligera CEAAB8 (VLCL_2A3)
SEQ ID NO: 43	Cadena pesada común (tipo salvaje)
SEQ ID NO: 44	Cadena pesada común (mutación LALA)
SEQ ID NO: 45	Cadena pesada común (mutación LALA+P329A)
SEQ ID NO: 46	VK_SM3E
SEQ ID NO: 47	VH_SM3E
SEQ ID NO: 48	VL_MEDI
SEQ ID NO: 49	VH_MEDI
SEQ ID NO: 50	VK_SAR
SEQ ID NO: 51	VH_SAR
SEQ ID NO: 52	VK_CH1A1A
SEQ ID NO: 53	VH_CH1A1A
SEQ ID NO: 54	VK_T84,66
SEQ ID NO: 55	VH_T84,66
SEQ ID NO: 56	VK_LABETUZUMAB
SEQ ID NO: 57	VH_LABETUZUMAB
SEQ ID NO: 58	Región constante de cadena ligera kappa híbrida (H-CK 5)
SEQ ID NO: 59	CEA VL 1B4
SEQ ID NO: 60	CEA 1B4 CDRL1
SEQ ID NO: 61	CEA 1B4 CDRL2
SEQ ID NO: 62	CEA 1B4 CDRL3
SEQ ID NO: 63	CEA VL C11
SEQ ID NO: 64	CEA C11 CDRL1
SEQ ID NO: 65	CEA C11 CDRL2
SEQ ID NO: 66	CEA C11 CDRL3
SEQ ID NO: 67	huCD3 1B6 LC-kappa híbrida
SEQ ID NO: 68	huCD3 1A10 LC-kappa híbrida
SEQ ID NO: 69	huCD3 1F8 LC-kappa híbrida
SEQ ID NO: 70	huCD3 1A4 LC-kappa híbrida
SEQ ID NO: 71	huCD3 1H4 LC-kappa híbrida
SEQ ID NO: 72	CEA 2A3 LC-kappa híbrida (VLCK 2A3)
SEQ ID NO: 73	CEA C11 LC (VKCK_C11)
SEQ ID NO: 74	CEA 1B4 LC (VLCL_1B4)
SEQ ID NO: 75	CEA 1B4 LC-kappa híbrida (VLCK_1B4)
SEQ ID NO: 76	VKCK_C11 (DNA)
SEQ ID NO: 77	VLCL_1B4 (DNA)
SEQ ID NO: 78	VKCK_2F2 (AB1) (DNA)
SEQ ID NO: 79	VLCL_2A3 (AB8) (DNA)
SEQ ID NO: 80	Cadena pesada común VHCH (tipo salvaje; DNA)

LISTA DE SECUENCIAS

Número de secuencia	Se refiere a
SEQ ID NO: 81	CEA AB13 CDRL1
SEQ ID NO: 82	CEA AB13 CDRL2
SEQ ID NO: 83	CEA AB13 CDRL3
SEQ ID NO: 84	CEA AB14 CDRL1
SEQ ID NO: 85	CEA AB14 CDRL2
SEQ ID NO: 86	CEA AB14 CDRL3
SEQ ID NO: 87	CEA AB15 CDRL1
SEQ ID NO: 88	CEA AB15 CDRL2
SEQ ID NO: 89	CEA AB15 CDRL3
SEQ ID NO: 90	CEA AB17 CDRL1
SEQ ID NO: 91	CEA AB17 CDRL2
SEQ ID NO: 92	CEA AB17 CDRL3
SEQ ID NO: 93	CEA AB20 CDRL1
SEQ ID NO: 94	CEA AB20 CDRL2
SEQ ID NO: 95	CEA AB20 CDRL3
SEQ ID NO: 96	CEA AB54 CDRL1
SEQ ID NO: 97	CEA AB54 CDRL2
SEQ ID NO: 98	CEA AB54 CDRL3
SEQ ID NO: 99	CEA AB60 CDRL1
SEQ ID NO: 100	CEA AB60 CDRL2
SEQ ID NO: 101	CEA AB60 CDRL3
SEQ ID NO: 102	CEA AB66 CDRL1
SEQ ID NO: 103	CEA AB66 CDRL2
SEQ ID NO: 104	CEA AB66 CDRL3
SEQ ID NO: 105	CEA AB71 CDRL1
SEQ ID NO: 106	CEA AB71 CDRL2
SEQ ID NO: 107	CEA AB71 CDRL3
SEQ ID NO: 108	CEA AB72 CDRL1
SEQ ID NO: 109	CEA AB72 CDRL2
SEQ ID NO: 110	CEA AB72 CDRL3
SEQ ID NO: 111	CEA AB73 CDRL1
SEQ ID NO: 112	CEA AB73 CDRL2
SEQ ID NO: 113	CEA AB73 CDRL3
SEQ ID NO: 114	Región variable de cadena ligera CEA AB13 VL
SEQ ID NO: 115	Región variable de cadena ligera CEA AB14 VL
SEQ ID NO: 116	Región variable de cadena ligera CEA AB15 VL
SEQ ID NO: 117	Región variable de cadena ligera CEA AB17 VL
SEQ ID NO: 118	Región variable de cadena ligera CEA AB20 VL
SEQ ID NO: 119	Región variable de cadena ligera CEA AB54 VL
SEQ ID NO: 120	Región variable de cadena ligera CEA AB60 VL
SEQ ID NO: 121	Región variable de cadena ligera CEA AB66 VL
SEQ ID NO: 122	Región variable de cadena ligera CEA AB71 VL
SEQ ID NO: 123	Región variable de cadena ligera CEA AB72 VL
SEQ ID NO: 124	Región variable de cadena ligera CEA AB73 VL

LISTA DE SECUENCIAS

Número de secuencia	Se refiere a
SEQ ID NO: 125	Cadena ligera CEA AB 13 LC
SEQ ID NO: 126	Cadena ligera CEA AB 14 LC
SEQ ID NO: 127	Cadena ligera CEA AB15 LC
SEQ ID NO: 128	Cadena ligera CEA AB 17 LC
SEQ ID NO: 129	Cadena ligera CEA AB20 LC
SEQ ID NO: 130	Cadena ligera CEA AB54 LC
SEQ ID NO: 131	Cadena ligera CEA AB60 LC
SEQ ID NO: 132	Cadena ligera CEA AB66 LC
SEQ ID NO: 133	Cadena ligera CEA AB71 LC
SEQ ID NO: 134	Cadena ligera CEA AB72 LC
SEQ ID NO: 135	Cadena ligera CEA AB73 LC
SEQ ID NO: 136	Cadena ligera consenso CDR1 (XXSQVXXNLN)
SEQ ID NO: 137	Cadena ligera consenso CDR2 (XXXNRXX)
SEQ ID NO: 138	Cadena ligera consenso CDR3 (QXFXXXXEXNT)

EJEMPLOS**5 Ejemplo 1 Clonación, expresión y purificación de miembros humanos de la familia CEACAM****Clonación**

- 10 La secuencia correspondiente al dominio extracelular completo (ECD) y los dominios A3-B3 de CEACAM5 se sintetizaron y se subclonaron en el vector de expresión pEAK8 de mamífero (Edge Biosystems, Gaithersburg, Md.). Los vectores se modificaron para introducir un Avitag™ (Avidity, Denver Colo.) y una marca de hexa-histidina, una región FC humana o una región FC de ratón en el extremo C-terminal. Las construcciones se verificaron mediante secuenciación de ADN. La purificación de proteína soluble recombinante se llevó a cabo mediante IMAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados), FcXL o matriz de afinidad CaptureSelect™ IgG-Fc (ms) (Thermo Fisher Scientific).
- 15 También se generaron vectores que codifican para la versión completa de CEACAM humano 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 19, 20, 21 CEACAM5 y CEACAM6 de cinomolgo para expresión en la superficie celular de células PEAK y/o CHO. También se clonó de forma similar CEACAM16 humano soluble y de longitud completa.
- 20 Además, también se generaron vectores que codifican las siguientes versiones truncadas de CEACAM 5 humano para expresión en la superficie celular de células PEAK y/o CHO: A1-B1-A2-B2-A3-B3; B1-A2-B2-A3-B3; A2-B2-A3-B3; B2-A3-B3; A3-B3. El subdominio B3 se expresa como una proteína de fusión a los primeros 140 aa de la proteína CD86 humana.

Expresión

- 25 A continuación, los plásmidos mencionados anteriormente se transfecan en células de mamíferos utilizando un reactivo de transfección basado en liposomas como Lipofectamine2000 (Thermo Fisher Scientific). El paso de transfección requiere solo pequeñas cantidades de ADN y células, típicamente 4×10^5 células y 2 µg de ADN plasmídico por pocillo y la transfección se llevó a cabo en una placa de 6 pocillos. Aunque pueden utilizarse diferentes líneas celulares de mamíferos, en los ejemplos que se dan a continuación se transfecan células epiteliales de monocapa de riñón de embrión humano transformadas (células PEAK). Estas células expresan de forma estable el gen EBNA-1, apoyando aún más el proceso de replicación episómica, son semiadherentes y pueden crecer en condiciones de cultivo celular estándar (5 % de CO₂, 37 °C en medio DMEM complementado con 10 % de suero fetal de ternera). Tras 24 h, las células se colocan en condiciones selectivas añadiendo medio que contiene 0,5-2 µg/ml de puromicina: las células que albergan el vector episómico son resistentes a este antibiótico.

- 35 De dos a tres semanas después de la transfección, las células amplificadas y seleccionadas se inyectaron en biorreactores desechables CELLline™ (Sigma Aldrich) para el paso de producción. CELLline™ es un biorreactor de dos compartimentos que puede utilizarse en una incubadora de cultivo celular estándar. El compartimento más pequeño (15 ml) contiene las células y está separado de un compartimento más grande (un litro) que contiene el medio por una membrana semipermeable con un tamaño de corte de 10 kDa (Bruce et al. 2002, McDonald et al. 2005). Este sistema permite la difusión de nutrientes, gases y productos metabólicos de desecho, a la vez que retiene las células y las proteínas secretadas en el compartimento más pequeño. El cultivo se mantiene durante 7-10 días antes de cosechar el

sobrenadante. Como el medio contiene suero, las células mantienen una buena viabilidad y pueden generarse varias series de producción utilizando las mismas células y envases.

Purificación

5 Tras la cosecha, los sobrenadantes del cultivo celular se clarifican por centrifugación. A continuación, el sobrenadante se complementa con imidazol 100 mM y se carga en resina de cromatografía de afinidad Ni-NTA (Qiagen). La concentración relativamente alta de imidazol minimiza la unión de contaminantes a la resina. Después de lavado de la columna, las 10 proteínas se eluyen a una tasa de flujo de 2 mL/min utilizando un gradiente de imidazol de 30 mL (imidazol 20-400 mM) en un sistema de cromatografía AKTA Prime (Cytiva). El gradiente de elución mejora aún más la pureza de la proteína recombinante, pero puede sustituirse por un enfoque de elución en etapas si no se dispone de un sistema de 15 cromatografía. Las fracciones eluidas pueden analizarse por SDS-PAGE o ELISA para determinar su contenido en proteína recombinante. Las fracciones de interés se agrupan y se desalinizan en columnas Amicon® 10kDa (Millipore) equilibradas con solución salina tamponada de fosfato u otro tampón apropiado. A continuación, las proteínas desalinizadas pueden cuantificarse mediante diversas técnicas y su pureza puede analizarse por SDS-PAGE. Las 20 proteínas recombinantes se biotilan *in vitro* utilizando biotina ligasa (Avidity, Denver Colo.) según las instrucciones del fabricante. Tras la desalinización, el nivel de biotinilación se evalúa mediante ensayos pull-down utilizando perlas magnéticas de estreptavidina y análisis SDS-PAGE.

20 **Ejemplo 2 Selección mediante presentación en fagos de Fv de CEACAM5 utilizando bibliotecas de scFv humanos que contienen un dominio pesado variable fijo**

Los procedimientos generales para la construcción y la manipulación de bibliotecas humanas de scFv mostradas en el bacteriófago M13 se describen en Vaughan et al., (Nat. Biotech. 1996, 14:309-314).

25 Las bibliotecas para selección y cribado codifican scFv que comparten todos el mismo dominio VH y se diversifican únicamente en el dominio VL. Los métodos para la generación de bibliotecas de VH fijas y su uso para la identificación y el ensamblaje de anticuerpos biespecíficos se describen en los documentos de patente US 2012/0184716 y WO 2012/023053.

30 Los procedimientos para identificar la unión de scFv a CEACAM5 humano se describen a continuación.

Selecciones de proteínas

35 Se bloquean alícuotas de bibliotecas de fagos scFv (10^{12} Pfu) con PBS que contiene 3 % (w/v) de leche desnatada durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. Los fagos bloqueados se deseleccionan en perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads™ M-280) durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. Los fagos deseleccionados se incuban con 100 nM de CEACAM5 humano biotinilado o el dominio A3-B3 capturado en perlas magnéticas de estreptavidina durante dos horas a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. Las perlas se capturan 40 utilizando un soporte magnético seguido de cinco lavados con PBS/0,1 % Tween® 20 y dos lavados con PBS. Los fagos se eluyen con TEA 100 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. Los fagos y perlas eluidos se neutralizan con Tris-HCl 1M pH 7,4 y se añaden directamente a 10 ml de células TG1 de crecimiento exponencial (cepas de *E. coli* utilizadas comúnmente en la presentación de fagos) y se incuban durante una hora a 37°C con agitación lenta (90 rpm). Se diluye en serie una alícuota de TG1 infectadas para valorar el producto de selección. Las 45 TG1 infectadas restantes se centrifugan a 3800 rpm durante 10 minutos, se resuspenden en 2 ml de 2xTY y se extienden en placas de bioensayo de agar 2xTYAG (medio 2xTY que contiene 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa). Tras una incubación durante la noche a 30 °C, se añaden 10 ml de 2xTY a las placas y se raspan las células de la superficie y se transfieren a un tubo de polipropileno de 50 ml. Se añade una solución de glicerol al 50 % a la suspensión celular para obtener una concentración final de 17 % de glicerol. Las alícuotas de las rondas de selección se conservan a -80 °C.

50 **Rescate de fagos**

Se añaden 50 µl de la suspensión celular obtenida de las rondas de selección anteriores a 50 ml de 2xTYAG y se cultivan a 37 °C con agitación (240 rpm) hasta que se alcanza una OD₆₀₀ de 0,3 a 0,5. A continuación, se superinfecta el cultivo con $1,2 \times 10^{11}$ fagos auxiliares M13K07 y se incuba durante una hora a 37 °C (90 rpm). El medio se cambia centrifugando las células a 3800 rpm durante 10 minutos, eliminando el medio y resuspendiendo el sedimento en 50 ml de 2xTYAK (medio 2xTY que contiene 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina). A continuación, se hace crecer el cultivo durante toda la noche a 30 °C (240 rpm). Al día siguiente, el sobrenadante que contiene fagos se usa para la siguiente ronda de selección.

60 **Selecciones de la superficie celular**

Se bloquean los sobrenadantes que contienen fagos con PBS que contiene un 3 % (w/v) de leche desnatada durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. A continuación, los fagos bloqueados se deseleccionan durante una hora en células MKN-45 CEACAM5^{KO} que no expresan CEACAM5 humano. Los fagos deseleccionados se incuban con 2×10^7 de células MKN-45 que expresan CEACAM5 (bloqueadas en PBS, 3 % de BSA 0,1 % de NaN₃) durante dos

5 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las células se sedimentan y se lavan seis veces con PBS. Los fagos unidos se eluyen con ácido cítrico 76 mM y se agitan durante 10 minutos. Tras la neutralización con Tris-HCl 1 M pH 8, las células se añaden directamente a 10 ml de TG1 en crecimiento exponencial y se incuban durante una hora a 37 °C con agitación lenta. Se diluye en serie una alícuota de TG1 infectadas para valorar el producto de selección. Las TG1 10 infectadas se centrifugan a 3800 rpm durante 10 minutos, se resuspenden en 2 ml de medio 2xTY y se extienden en una placa de bioensayo de agar 2xTYAG. Tras incubar toda la noche a 30 °C, se añaden 10 ml de 2xTY a la placa y se raspan las células de la superficie, que se transfieren a un tubo de polipropileno de 50 ml. Se añade una solución de glicerol al 50 % a la suspensión celular para obtener una concentración final de 17 % de glicerol. Las alícuotas de las rondas de selección se conservan a -80 °C.

Ejemplo 3 Cribado de scFv de unión/no unión a CEACAM5, CEACAM6 y CEACAM1 solubles

Preparación periplásmica de scFv para pruebas de unión y funcionales

15 20 25 Los clones individuales de TG1 transformados a partir de los resultados de selección se inoculan en una placa de microtitulación de pocillos profundos que contiene 0,9 ml por pocillo de medio 2xTYAG (medio 2xTY que contiene 100 µg/ml de ampicilina al 0,1% de glucosa) y se cultivan a 37°C durante 5-6 horas (240 rpm). A continuación, se añaden 100 µl por pocillo de IPTG 0,2 mM en medio 2xTY para obtener una concentración final de IPTG 0,02 mM. La placa se incuba durante toda la noche a 30 °C con agitación a 240 rpm. La placa de pocillos profundos se centrifuga a 3200 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se elimina cuidadosamente el sobrenadante. Los gránulos se resuspenden en 150 µl de tampón TES (Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), 20 % de sacarosa, complementado con inhibidor de proteasa completo, Roche). Se produce un choque hipotónico añadiendo 150 µl de tampón TES diluido (dilución 1:5 de TES:agua) y se incuba en hielo durante 30 minutos. La placa se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para separar las células y los residuos. Los sobrenadantes se transfieren cuidadosamente a otra placa de microtitulación y se mantienen en hielo para su análisis inmediato en ensayos funcionales o ensayos de unión.

Unión

30 35 El cribado de scFv para la unión a CEACAM5 se prueba en un ensayo homogéneo utilizando la tecnología CellInsight™. Los siguientes reactivos se mezclan en cada pocillo de una placa de pocillos de fondo transparente 384 (Corning): 30 µl de una suspensión de microesferas de poliestireno con estreptavidina (Polysciences; 3000 microesferas/pocillo) recubiertas con CEACAM5 biotinilada, dominio A3-B3 biotinilado o NusA biotinilada para una proteína de control; 60 µl de preparación periplásmica de scFv bloqueada; 10 µl de tampón de detección (PBS que contiene anticuerpo anti-c-myc de ratón a 5 µg/ml; AlexaFluor® 647 anti-Fc de ratón diluido 1:200). Despues de mezclado a 600 rpm durante 5 minutos, la placa de 384 pocillos se incuba a temperatura ambiente y se lee después de 2 horas en una plataforma de cribado de contenido elevado CellInsight™ CXS (ThermoFisher Scientific). Los clones que expresan scFv que dan una señal específica para CEACAM5 y no para NusA se seleccionan para análisis posteriores o secuenciación.

40 La unión a CEACAM1, CEACAM6 y otras CEACAM pueden medirse de la misma manera.

Secuenciación de clones

45 Los clones individuales se inoculan en una placa de microtitulación de 96 pocillos profundos que contiene 1 ml de medio LBAG (medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa) por pocillo y se cultivan durante la noche a 37 °C, 300 rpm. El ADN se extrae utilizando el kit Zippy-96 Plasmid Miniprep (Zymo Research) y se secuencia.

Ejemplo 4 Candidatos a VH fijos reformateados en IgG y expresión transitoria en células de mamífero

50 55 60 Tras el cribado y la secuenciación, los candidatos a scFv con las propiedades de unión deseadas se reformatean en IgG y se expresan mediante transfección transitoria en células PEAK. Las secuencias de VH y VL de los scFv seleccionados se amplifican con oligonucleótidos específicos y se cloran en un vector de expresión que contiene las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, y las construcciones se verifican mediante secuenciación. Los vectores de expresión se transfecan en células de mamífero utilizando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se cultivan 4×10^6 células PEAK en matraces T75 en 25 ml de medio de cultivo con suero bovino fetal. Las células transfectadas se cultivan durante 5-6 días a 37°C, la producción de IgG se cuantifica utilizando un instrumento Octet RED96. El sobrenadante se cosecha para la purificación de IgG en resina de afinidad FcXL (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, los sobrenadantes de células transfectadas se incuban durante la noche a 4 °C con una cantidad apropiada de resina FcXL. Tras el lavado de la resina con PBS, las muestras se cargan en la columna Amicon Pro y, en consecuencia, se eluye IgG en glicina 50 mM pH 3,5. A continuación, la fracción de IgG eluida se dializa con Amicon 50kDa contra tampón NaCl de histidina pH 6,0 y el contenido de IgG se cuantifica por absorción a 280 nm. La pureza y la integridad de IgG se verifican mediante electroforesis utilizando un Bioanalizador Agilent 2100 según las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA).

Ejemplo 5 Caracterización de anticuerpos monoclonales CEACAM5**a) Unión de ramas anti-CEACAMS a células transfectadas con diferentes miembros de la familia CEACAM**

La especificidad de las ramas de anticuerpos anti-CEACAM5 (probados como anticuerpos mAbs bivalentes o bsAbs monovalentes) se muestra mediante citometría de flujo utilizando células PEAK y/o CHO transfectadas con diferentes miembros de la familia CEACAM.

5 Los vectores que codifican la versión de longitud completa de CEACAM humano 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 19, 20 y 21 y 20 se usan para expresar estas proteínas en la superficie de células PEAK y/o CHO como se describe en el Ejemplo 1. Del mismo modo, los vectores que codifican la versión de longitud completa de cyno CEACAM 5 y 6 se usan también para expresar estas proteínas en la superficie de células PEAK y/o CHO. Las células PEAK y/o CHO no transfectadas se usan como control negativo. Las células se cosechan, se cuentan y se comprueba su viabilidad y se resuspenden en 3×10^6 células/ml en tampón FACS (PBS 2 % de BSA, 0,1 % de NaN₃). Se distribuyen 100 µl de la suspensión celular en placas de 96 pocillos con fondo en V (3×10^5 células/pocillo). El sobrenadante se elimina por centrifugación 3 minutos a 4 °C, 1300 rpm y las células se incuban durante 15 minutos a 4 °C con concentraciones crecientes del anticuerpo según la invención. Los anticuerpos que portan las ramas anti-CEACAMS a probar se diluyen en tampón FACS y el intervalo de concentración es 30 pM-500 nM. Las células se lavan dos veces con tampón FACS frío y se reincuban durante 15 minutos más a 4°C con un anticuerpo secundario anti-IgG humana compatible. Las células se lavan dos veces con tampón FACS frío y se resuspenden en 300 µl de tampón FACS con TOPRO-3 diluido 1:1500 (Invitrogen). La fluorescencia se mide utilizando un FACSCalibur™ (BD Biosciences) o una plataforma Cytoflex (Beckman Coulter). Las curvas de unión dosis-respuesta se ajustan utilizando el software GraphPad Prism8. Del mismo modo, pueden caracterizarse CEACAM1, 10 CEACAM6 y otros CEACAM.

10

15

20

25 Los resultados obtenidos mediante el uso de los procedimientos experimentales descritos en los Ejemplos 1 y 5a se muestran en las Tablas 2 y 3 (a 10 mcg/ml de los anticuerpos de tamaño completo probados; se probó BiTE MEDI-565 a concentración equimolar). Para los anticuerpos biespecíficos AB17L3-1/N, AB71L3-1/N, AB72L3-1/N, AB73L3-1/N, la MFI medida para la unión a células transfectadas con CEACAM5 se encontró entre 29000 y 41000 (Tabla 2). Por el contrario, la MFI hallada mediante utilización de células PEAK transfectadas con CEACAM 1,3,4,6,8 se encontraron por debajo de 1000 con la única excepción de una fuerte señal de AB72L3-1/N en células transfectadas con CEACAM8. Cuando los valores de MFI obtenidos en células transfectadas que expresan cualquier CEACAM dado se dividen entre los valores obtenidos en células WT PEAK, se pueden calcular "factores a PEAK WT" (Tabla 3). Con la excepción de AB72L3-1/N, 30 todos los anticuerpos de la invención son específicos a CEACAM5, ya que todos los valores de "factor a PEAK WT" están por debajo de 2,0. Por el contrario, MEDI-565 BiTE muestra un "factor a PEAK WT" superior a 2 para CEACAM8, lo que sugiere una reactividad cruzada para tal miembro de la familia CEACAM. Esto podría causar, por ejemplo, la destrucción de neutrófilos debido a que, como se mencionó ya anteriormente, los neutrófilos humanos expresan CEACAM8 en la superficie.

35

TABLA 2 Unión a CEACAMx expresada de manera transitoria en células PEAK [MFI]

MFI de unión	PEAK WT	CEACAM5	CEACAM1	CEACAM3	CEACAM4	CEACAM6	CEACAM8
AB1L3-1/N	461	7746	441	358	330	373	343
AB17L3-1/N	530	29209	652	633	431	541	411
AB71L3-1/N	440	35076	451	358	323	420	391
AB72L3-1/N	481	41029	652	474	402	562	6289
AB73L3-1/N	512	36240	542	465	352	490	401
MEDI-565 BiTE	1175	18414	1468	943	1338	1829	24002
Y4L3-1/N	253	396	283	298	283	275	249

TABLA 3 Unión a CEACAMx expresada de manera transitoria en células PEAK [factor a PEAK WT]

Factor a PEAK WT	PEAK WT	CEACAM5	CEACAM1	CEACAM3	CEACAM4	CEACAM6	CEACAM8
AB1L3-1/N	1,0	16,8	1,0	0,8	0,7	0,8	0,7
AB17L3-1/N	1,0	55,1	1,2	1,2	0,8	1,0	0,8
AB71L3-1/N	1,0	79,7	1,0	0,8	0,7	1,0	0,9
AB72L3-1/N	1,0	85,3	1,4	1,0	0,8	1,2	13,1
AB73L3-1/N	1,0	70,8	1,1	0,9	0,7	1,0	0,8
MEDI-565 BiTE	1,0	15,7	1,2	0,8	1,1	1,6	20,4

Factor a PEAK WT	PEAK WT	CEACAM5	CEACAM1	CEACAM3	CEACAM4	CEACAM6	CEACAM8
Y4L3-1/N	1,0	1,6	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0

b) Unión de anticuerpos monoclonales CEACAM5 a proteínas recombinantes en el ensayo de inmunoabsorción vinculado a enzimas (ELISA)

5

La proteína CEACAM5 humana recombinante biotinilada se captura en 0,5 µg/mL en una microplaca de 96 pocillos recubierta de estreptavidina. La placa se lava y se añaden anticuerpos bivalentes monoclonales anti-TAA de la presente invención como un amplio intervalo de concentración (por ejemplo de 5×10^{-4} a 1 µg/mL) y se incuban durante 1 hora. La placa se lava y los anticuerpos unidos se detectan con una IgG(Fc)-HRP anti-humana (Jackson ImmunoResearch). Despues del lavado, la placa se revela con reactivo Amplex Red®(Molecular Probes). La señal de fluorescencia se mide en un lector de placas Synergy HT (Bioteck).

10

La unión a otros miembros recombinantes de la familia CEACAM, como CEACAM1 y CEACAM6, se puede evaluar de manera similar. Los resultados de unión se muestran en las Figuras 8 y 9 para mAb 1B4 y mAb C11, respectivamente.

15

c) Agrupamiento de epítopos de los anticuerpos de la invención mediante competencia con anticuerpos de referencia

20

El agrupamiento de epítopos es un inmunoensayo competitivo utilizado, por ejemplo, para caracterizar la unión de nuevos anticuerpos monoclonales contra una proteína diana. Se crea un perfil de bloqueo competitivo de un nuevo anticuerpo que se une a la proteína diana contra anticuerpos que también se unen a esta proteína diana y para los cuales el epítopo de unión ya se ha establecido/publicado. La competencia a uno de estos anticuerpos de referencia indica que el nuevo anticuerpo tiene el mismo epítopo o uno muy cercano y están "agrupados".

25

La capacidad de mAbs CEACAM5 de la presente invención para competir con anticuerpos de referencia CEACAM5 se prueba mediante ELISA en CEACAM5 humano recombinante con los siguientes anticuerpos de referencia que portan una región Fc de ratón: SM3E, mAb derivado de sm3E descrito en la patente US20050147614A1; MEDI, mAb derivado de MEDI-565 descrito en la patente WO2016036678A1; SAR, mAb derivado de Mab2_VLg5VHg2 descrito en la patente EP3199552A1; CH1A1A, mAb derivado de CH1A1A-2F1 descrito en la patente US20120251529 y por Klein et al en Oncoimmunology, 11 de enero de 2017; 6(3); T84.66 humanizado, mAb derivado de variant 1 descrito en la patente WO2017055389; LAB, mAb derivado de hMN14 descrito en la patente US 2002/0165360 A1.

30

SM3E se une, por ejemplo, más a la parte N-terminal, distal a la membrana celular de CEA, MEDI a la parte media y CH1A1A se une cerca de la membrana.

35

El CEACAM5 humano biotinilado se recubre a 0,5 µg/ml en una placa de 96 pocillos recubierta de estreptavidina y se incuba con 10 µg/ml de los mAbs de referencia o un mAb irrelevante portador de una región Fc de ratón durante 1 hora. Los mAbs CEACAM5 de la presente invención (es decir, los anticuerpos monoclonales bivalentes anti-CEA) se añaden a 0,2 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava la placa y los mAbs CEACAM5 unidos se detectan con un anti-IgG(Fc)-HRP humano (Jackson ImmunoResearch). Despues del lavado, la placa se revela con reactivo Amplex ®. La señal de fluorescencia se mide en un lector de placas Synergy HT (Bioteck).

40

Basándose en los resultados encontrados con los mAbs CEACAM5, los bsAbs CEAxCD3 derivados según la invención se consideran competitivos con un anticuerpo de referencia en caso de que la unión a CEACAM5 se reduzca en más de 80 % si se comparan los resultados con y sin adición de un anticuerpo herramienta. Un anticuerpo CEAxCD3 se identifica como no competitivo con un anticuerpo herramienta en caso de que la unión a CEACAM5 se reduzca en menos de 20 % si se comparan los resultados con y sin adición de un anticuerpo herramienta. La Figura 1 muestra de forma esquemática las regiones de unión de los anticuerpos de referencia utilizados en los Ejemplos 5c.

50

d) Determinación del dominio CEACAM5 unido por los anticuerpos de la invención utilizando la forma truncada de CEACAM5

Utilizando formas truncadas de CEACAM5 que carecen de uno o más de sus dominios extracelulares, se podría determinar el subdominio al que se unen los anticuerpos de la invención.

55

Los vectores que codifican la versión de longitud completa de CEACAM5 humano (que contiene todos sus dominios extracelulares, y particularmente N-A1-B1-A2-B2-A3-B3), así como vectores que codifican solo un subconjunto de los dominios extracelulares de CEACAM5 (A1-B1-A2-B2-A3-B3; B1-A2-B2-A3-B3; A2-B2-A3-B3; B2-A3-B3; A3-B3 y B3) se utilizan para expresar estas proteínas en la superficie de las células PEAK y/o CHO como se describe en el Ejemplo 1. Las células PEAK y/o CHO no transfectadas se usan como control negativo. La tinción y adquisición por citometría de flujo se realizan como se describe en el Ejemplo 5, subsección a).

Según la invención, se ha encontrado que un anticuerpo se une a una proteína CEACAM5 truncada dada si el anticuerpo unido es detectado por el anticuerpo secundario anti-IgG Fc humano conjugado con PE.

Ejemplo 6 Expresión y purificación de anticuerpos biespecíficos portadores de una cadena ligera lambda y kappa

5 La expresión simultánea de una cadena pesada y dos cadenas ligeras en la misma célula puede conducir al ensamblaje de tres anticuerpos diferentes. La expresión simultánea puede lograrse de diferentes maneras, tales como la transfección de múltiples vectores que expresen una de las cadenas a coexpresar o mediante el uso de vectores que impulsen la expresión de múltiples genes. El vector que codifica los diferentes anticuerpos anti-CEACAM5 se cotransfecta con otro 10 vector que expresa la cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-CD3. Alternativamente, las dos cadenas ligeras se clonian en el vector pNovi κλ, que se ha generado previamente para permitir la coexpresión de una cadena pesada, una cadena ligera kappa y una cadena ligera lambda como se describe en los documentos de patente US 2012/0184716 y WO 2012/023053.

15 La expresión de los tres genes está impulsada por promotores del citomegalovirus humano (hCMV) y el vector también contiene un gen de glutamina sintetasa (GS) que permite la selección y el establecimiento de líneas celulares estables. Los genes VH y VL comunes de anti-CEACAM5 IgG y de anti-CD3 IgG se clonian en el vector pNovi κλ, para la expresión transiente en células de mamíferos. Las células Expi293 se cultivan en suspensión en un matraz Erlenmeyer apropiado con número adecuado de células y un volumen medio de cultivo. El ADN plasmídico se transfecta finalmente en células 20 Expi293 utilizando PEI. La concentración de anticuerpos en el sobrenadante de células transfectadas se mide durante la producción utilizando un Octet RED96. Según la concentración de anticuerpos, los sobrenadantes se cosechan 5 a 7 días después de la transfección y se clarifican por centrifugación a 1300 g durante 10 min. La purificación se basa en un proceso de purificación de tres pasos. En primer lugar, la matriz de afinidad CaptureSelect™ FcXL (Thermo Fisher 25 Scientific) se lava con PBS y después se añade al sobrenadante clarificado. Después de la incubación durante la noche a +4°C y 20 rpm se centrifugan los sobrenadantes a 2000 g durante 10 min, se almacena el flujo y se lava la resina dos veces con PBS. A continuación, la resina se transfiere a columnas Amicon Pro y se utiliza una solución que contiene glicina 50 mM a pH 3,0 para la elución. Se generan varias fracciones de elución, se neutralizan con Tris-HCl pH 7,4 y se 30 reúnen. La reserva que contiene el total de IgGs humanos (los anticuerpos biespecíficos y los dos monoespecíficos) se cuantifica utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del.) y después se incuba durante 30 min a RT y a 20 rpm con el volumen apropiado de matriz de afinidad CaptureSelect™ KappaXL (Thermo Fisher 35 Scientific). GE Healthcare). Los pasos de recuperación de resina y lavado, elución y neutralización, se realizan como se describió anteriormente. El último paso de purificación por afinidad se realiza utilizando la matriz de afinidad CaptureSelect™ lambda Fab (Thermo Fisher Scientific) aplicando el mismo proceso que para el paso de purificación kappa. Todas las fracciones de elución se reúnen y se desalinizan contra tampón de formulación His-NaCl pH6 utilizando unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra de 50kDa (Merck Millipore). El producto final se cuantifica utilizando el Nanodrop.

40 Los anticuerpos biespecíficos purificados se analizan por electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras utilizando el Bioanalizador Agilent 2100 con el kit Protein 80 como se describe por el fabricante (Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA). Se mezclan 4 µl de muestras purificadas con tampón de muestra suplementado con ditiotreitol (DTT; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Las muestras se calientan a 95°C durante 5 minutos y después se cargan en el chip. Todas las muestras se analizan para detectar contaminación por endotoxinas utilizando el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (LAL; Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.).

Ejemplo 7: caracterización in vitro de anticuerpos monovalentes y biespecíficos

45 a) Unión de anticuerpos monovalentes y biespecíficos a células que expresan CEACAM5 y células que no expresan CEACAM5

50 Para demostrar la unión de anticuerpos CD3 x CEACAM5 κλ a células diana, se puede realizar una serie de experimentos basados en citometría de flujo que comparan la unión de anticuerpos CD3xCEACAM5 κλ a sus homólogos monovalentes. Algunos ejemplos de células que se pueden utilizar son las líneas celulares CEACAM5 positivas, como la línea celular de adenocarcinoma gástrico MKN45 (que expresa 155.000 moléculas de CEACAM5 por célula) o la línea celular de adenocarcinoma de páncreas HPAF-II (que expresa 108.000 moléculas de CEACAM5 por célula) o la línea celular de adenocarcinoma colorrectal LS174T (que expresa 26.000 CEACAM5 moléculas por célula) y líneas celulares CEACAM5 negativas, como la línea celular de carcinoma de pulmón A549 y la línea celular knock-out MKN45 CEACAM5 generada por metodología CRISPR-CAS9. La evaluación de tinción celular y unión se puede realizar como se describe anteriormente. Las curvas de unión obtenidas se muestran en las Figuras 4, 5, 11 y 14. Los valores de EC50 se pueden calcular utilizando GraphPad Prism8 para la unión a células MKN45; los datos se muestran en la Tabla 4. La unión de bsAb de la invención a 200 nM, 1000 nM y 5000 nM es 40 % y superior en comparación con la unión de TCB2014 (véase la Tabla 4 y también las Figuras 11 y 14).

TABLA 4: EC50 de unión a células MKN-45. N/A: no aplicable

	CE ₅₀ (nM)	Valor de MFI superior
AB17L3-1/N	59,2	862'218

	CE ₅₀ (nM)	Valor de MFI superior
AB54L3-1/N	66,4	759'782
AB60L3-1/N	64,1	989'186
AB66L3-1/N	24,3	759'391
AB71L3-1/N	34,1	833'116
AB72L3-1/N	24,5	962'960
AB73L3-1/N	27,8	920'523
Y4L3-1/N	N/A	N/A
TCB2014	11,6	327'315

b) Unión de anticuerpos monovalentes y biespecíficos a células que expresan CD3 y células que no expresan CD3

5

Para demostrar la unión de anticuerpos CD3 x CEACAM5 κλ a células T efectoras, se puede realizar una serie de experimentos basados en citometría de flujo que comparan la unión de anticuerpos CD3xCEACAM5 κλ a sus homólogos monovalentes. Algunos ejemplos de células que se pueden utilizar son células T primarias humanas, así como líneas celulares CD3 positivas (Jurkat y/o HUT 78) o CD3 negativas (TIB-153 y/o JKT-beta-del). La evaluación de tinción celular y unión se puede realizar como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 10.

10

c) Agrupamiento de epítopos de anticuerpos CEACAM5 mediante competencia con anticuerpos de referencia

15

La agrupación de epítopos es un inmunoensayo competitivo usado para caracterizar la unión de anticuerpos según la invención o, por ejemplo, la unión de los anticuerpos anti-CEA relacionados (proteína diana) de la primera parte de unión. Se crea un perfil de bloqueo competitivo de un anticuerpo que se une a la proteína diana frente a anticuerpos que también se unen a esta proteína diana y para los que ya se ha establecido/publicado el epítopo de unión. La competencia con uno de estos anticuerpos de referencia indica que el anticuerpo tiene el mismo epítopo o uno muy cercano y están "agrupados". La capacidad de ramas anti CEACAM5, que son parte de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención, para competir con anticuerpos de referencia anti CEACAM5 se prueba mediante ELISA con CEACAM5 humano recombinante con los siguientes anticuerpos de referencia que portan una región Fc de ratón: SM3E, secuencias de mAb derivadas de SM3E descrito en la patente US20050147614A1, mAb producido utilizando métodos estándar; MED1, mAb derivadas de MED1-565 descrito en la patente WO2016036678A1;CH1A1A, mAb derivadas de CH1A1A-2F1 descrito en la patente US20120251529 y por Klein et al in Oncoimmunology, 11 de enero de 2017; 6(3). SM3E se une más a la parte N-terminal, distal a la membrana celular de CEA, MED1 a la parte media y CH1A1A se une cerca de la membrana.

20

25

Los cuerpos κλ, utilizados a 1 µg/ml, son capturados por anti IgG(Fcγ) humana de cabra (Jackson ImmunoResearch) recubierto a 10 µg/ml en una microplaca negra de 96 pocillos y bloqueado con tampón de bloqueo (PBS 2 % de BSA, 0,05 % de Tween 20). Las IgG competidoras (0,03 a 20 µg/ml) se preincuban durante 1 hora con 0,1 µg/ml de CEACAM5 humano biotinilado en tampón de bloqueo. La placa corporal κλ se lava y se incuba con la mezcla IgG/CEACAM5 competidora incubada durante 1 hora. Después del lavado, se detecta el CEACAM5 con estreptavidina-HRP (Jackson ImmunoResearch). La placa se revela con el reactivo Amplex™ Red (Molecular Probes) y la señal de fluorescencia se mide en un lector de placa Synergy HT (Biotek).

30

35

40

Si la unión de CEACAM5 a los cuerpos κλ se reduce por el respectivo anticuerpo herramienta en 80 % o más, se puede concluir que el anticuerpo biespecífico CEAxCD3 se clasifica para unirse competitivamente con el anticuerpo herramienta. Por lo tanto, un anticuerpo CEAxCD3 se identifica como no competitivo con un anticuerpo herramienta en caso de que la unión de CEACAM5 al respectivo cuerpo κλ se reduzca en 20 % o menos si se comparan los resultados con y sin adición de un anticuerpo herramienta.

45

d) Unión de anticuerpos biespecíficos a células sanguíneas humanas primarias

50

45

Para demostrar la unión de anticuerpos CD3 x CEACAM5 κλ a células T primarias y la falta de unión a células B primarias y monocitos (poblaciones CEA negativas), se puede realizar una serie de experimentos basados en citometría de flujo. La evaluación de tinción celular y unión se puede realizar como se describe en el Ejemplo 7a. Los datos se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 8: Citotoxicidad celular dependiente de células T (TDCC) mediada por anticuerpos biespecíficos**a) TDCC de líneas celulares CEACAM5 positivas y CEACAM5 negativas**

La citotoxicidad celular dependiente de células T (TDCC) de diferentes líneas celulares tumorales CEACAM5 positivas y CEACAM5 negativas inducidas por los anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 de la presente invención se evalúa utilizando PBMC humanas o células T primarias purificadas como células efectoras.

- 5 Las células diana se separan con tripsina o solución de disociación celular después de dos lavados con PBS. Después de una etapa de centrifugación, las células se resuspenden en medio de ensayo, se ajustan a la concentración requerida y se siembran en placas de 96 pocillos.
- 10 Las células efectoras pueden ser células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) o células T purificadas. Las PBMC se aíslan de capas leucocitarias de donantes humanos sanos utilizando tubos SepMate™ (Stemcell Technologies) con tampón Lymphoprep™ (Stemcell Technologies). Si se utilizan células T purificadas como células efectoras, se realiza una etapa de purificación adicional donde las células T se aíslan negativamente de las PBMC con el uso de un kit de selección negativa inmunomagnética de células T (STEMCELL Technologies).
- 15 Para el ensayo TDCC, cuando se utilizan PBMC como células efectoras, estas se añaden a las células diana a una relación E:T final de 10: 1; cuando se utilizan células T purificadas, se utiliza una relación E:T final de 5:1. A continuación, los anticuerpos CEAxCD3 de la invención y los anticuerpos de control relevantes se añaden a una concentración de intervalo de dosis (hasta 100 nM en duplicados) a las células diana y efectoras sembradas previamente. La destrucción de células diana se evalúa después de 24 h, 48 h o 72 h de incubación a 37°C, 5 % de CO₂ mediante cuantificación de 20 LDH liberada en el medio por células apoptóticas/necróticas (Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH), Roche). Se obtuvo liberación máxima de LDH (= 100 % de lisis) mediante incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. La liberación espontánea de LDH (= 0 % de lisis) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin ningún anticuerpo añadido. Las curvas TDCC (Figuras 6, 7, 12 y 15) y los valores de EC50 (Tabla 5) se pueden calcular utilizando GraphPad Prism8 para líneas celulares MKN-45 y LS174T, la EC50 hallada con bsAb de la invención mostrada en la Tabla 5 es 25 significativamente menor que la EC50 medida con TCB2014, lo que demuestra una mayor potencia para la destrucción de células tumorales in vitro de estos bsAb de la invención.

TABLA 5 EC50 de destrucción de tres líneas celulares CEA+

CE ₅₀ (nM)	MKN45	HPAFII	LS174T
AB17L3-1/N	0,11	0,16	0,25
AB54L3-1/N	0,11	0,10	0,13
AB60L3-1/N	0,13	0,28	0,21
AB66L3-1/N	0,05	0,20	0,22
AB71L3-1/N	0,09	0,16	0,16
AB72L3-1/N	0,02	0,12	0,11
AB73L3-1/N	0,03	0,13	0,06
TCB2014	0,85	0,45	1,87
Y4L3-1/N	N/A	N/A	N/A

30

b) Ensayo de destrucción mediante combinación de anticuerpos biespecíficos CEAxCD3 y CEAxCD47

- 35 Las combinaciones de un anticuerpo biespecífico de esta invención con un mAb anti CD47 (como se describe en el documento de patente US20140140989 y en el documento de patente WO2017196793) o con un anticuerpo biespecífico CEAxCD47 (descrito en el documento de patente PCT/IB2019/054559), pueden probarse en los modelos descritos anteriormente. Se añaden condiciones de prueba adicionales al diseño experimental, en las que tal anticuerpo dirigido a CD47 (monoespecífico o biespecífico) se utiliza solo o en combinación con un anticuerpo CEAxCD3 de la presente invención, a diferentes dosis.

40

c) Regulación ascendente de marcadores de activación de células T tras la destrucción de células tumorales que expresan CEA inducidas por bsAbs CEAxCD3

- 45 La destrucción de células tumorales CEA positivas inducida por bsAbs CEAxCD3 requiere la activación de células T, que se puede cuantificar mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos que reconocen marcadores específicos de activación de células T como CD69 (marcador de activación temprana) o CD25 (marcador de activación tardía).

- 50 Para evaluar el estado de activación de células T al final de un ensayo de destrucción (descrito anteriormente, Ejemplo 8a), se sigue el siguiente procedimiento: se transfieren células flotantes (que incluyen células T CD4+ y CD8+) a una nueva placa de 96 pocillos con fondo en V. El sobrenadante se elimina mediante centrifugación (3 minutos a 4°C, 1300 rpm) y las células se lavan dos veces con tampón FACS frío (PBS 2 % de BSA, 0,1% de NaN3) antes de ser incubadas

durante 15 minutos a 4°C con reactivo Fc-block (BD Biosciences). Despues de dos lavados con tampón FACS se incuban las células durante 15 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos (utilizados segun las recomendaciones del fabricante): Anti CD45 (conjugado con V500, BD Biosciences), CD69 (conjugado con FITC, Biolegend), CD8 (conjugado con PerCP-Cy5.5, Biolegend), CD25 (conjugado con PE, Biolegend), CD4 (conjugado con APC, ThermoFisher), CD3 (conjugado con APC-R700, BD Biosciences).

Las células se lavan dos veces con tampón FACS frío y se resuspenden en 200 µl de tampón FACS. Se mide la fluorescencia utilizando una plataforma Cytoflex (Beckman Coulter) y se analizan los datos utilizando el software FlowJo™ v10 (BD Life Sciences). Los resultados se muestran en la Figura 17.

10 **d) Proliferación de células T inducida por moléculas de bsAbs CEAxCD3**

Se analiza la capacidad de los bsAbs CEAxCD3 para inducir la proliferación de células T tras la reticulación en presencia de células diana tumorales CEA positivas. Como un control negativo, tambien se utilizan células malignas CEA negativas. 15 Las PBMC humanas recién aisladas se ajustan a 1 millón de células por ml en PBS caliente y se tiñen con succinimidil éster de diacetato de carboxilfluoresceína 0,2 µM (CFSE, ThermoFisher Scientific) en PBS durante 15 min a 37°C, se lavan varias veces con medio RPMI completo (que contiene 10 % de FCS, L-glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM, HEPES 10mM, 2-mercaptopropano 50 µM y 25 µg/mL de gentamicina) y se transfieren a placas de 96 pocillos a 2×10^6 células por mL. Se siembran $0,02 \times 10^6$ células diana por pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos y se añaden 20 los diferentes bsAbs CEAxCD3 a las concentraciones indicadas. Se añaden PBMC etiquetadas con CFSE para obtener una relación E:T final de 10: 1 y las placas de ensayo se incuban durante cinco días en una incubadora humidificada a 37°C. El quinto día se cosechan las células efectoras, se lavan dos veces con tampón FACS (PBS, 2 % de BSA, 0,1 % de NaN3), las células se tiñen entonces con BD Horizon 620 (BD Biosciences, 564996) para excluir células muertas y con 25 anti CD45 (conjugado con V500, BD Biosciences), anti-CD4-APC (ThermoFischer, 17-0049-41) y anti-CD8-PerCP-Cy5.5 (Biolegend, 301032). La tinción con CFSE se analiza en células vivas CD4⁺ o CD8⁺ mediante citometría de flujo utilizando un CytoFLEX (Beckman Coulter) y los resultados se evalúan con el software FlowJo.

30 **e) Citocina liberada en el sobrenadante tras la destrucción de células tumorales que expresan CEA inducidas por bsAbs CEAxCD3**

La destrucción de células tumorales CEA-positivas inducidas por bsAbs CEAxCD3 requiere la activación de células T. Tras la activación, las células T pueden liberar múltiples citocinas que pueden actuar como agentes inmunomoduladores. La capacidad de los anticuerpos biespecíficos de esta invención para inducir la liberación de citocinas por células T tras 35 la destrucción de células tumorales que expresan CEA se evaluó mediante la cuantificación de citocinas seleccionadas en el sobrenadante al final de los ensayos de TDCC descritos en el Ejemplo 8a. Despues de 2 días de cocultivo de células diana CEA positivas y células T efectoras CD3 positivas, los sobrenadantes de cultivo se cosecharon por centrifugación y se almacenaron congelados a - 80° hasta el posterior análisis. Se cuantificaron citocinas/enzimas como Granzima B, IL2, IL6, IL10, TNFα y IFNγ utilizando la plataforma Mesoscale Discovery mediante el uso de kits multiplex y los resultados se muestran en la Figura 16.

40 **f) TDCC de célula CEACAM5 positiva en presencia de CEA desprendido**

Se sabe que los tumores CEA positivos desprenden CEA. Este tipo de CEA podría tener un impacto negativo en la eficacia antitumoral de anticuerpos dirigidos a CEA que no se unen preferentemente a CEA unidos a la membrana. Para evaluar 45 si los anticuerpos biespecíficos de esta invención se ven afectados por CEA desprendido (sCEA), se lleva a cabo el ensayo de citotoxicidad celular dependiente de células T (TDCC) descrito en el Ejemplo 8a en presencia de una concentración variable de sCEA enriquecido (BioRad# PHP282). A continuación se comparan los valores de EC50 en presencia de sCEA con los valores de EC50 obtenidos en ausencia de sCEA (Tabla 6). La EC50 calculada para una concentración de sCEA dada (0,2, 1 o 1 µg/mL) se compara entonces con la obtenida en ausencia de sCEA (0 µg/mL) y se expresa como cambio 50 de EC50 veces mayor en comparación con condición sin CEA desprendido. Tales valores se presentan en la Tabla 7.

TABLE 6 EC50 de destrucción de células LS174T en presencia de sCEA

	sCEA µg/mL			
	0	0,2	1	5
AB17L3-1/N	0,02	0,07	0,11	0,25
AB54L3-1/N	0,04	0,03	0,16	0,20
AB60L3-1/N	0,29	0,27	0,24	0,38
AB66L3-1/N	0,11	0,13	0,22	0,33
AB71L3-1/N	0,08	0,04	0,31	0,41
AB72L3-1/N	0,06	0,07	0,14	0,43
AB73L3-1/N	0,04	0,04	0,13	0,32

	sCEA µg/mL			
	0	0,2	1	5
Y4L3-1/N	N/A	N/A	N/A	N/A
TCB2014	0,37	0,12	3,71	19,83*
TCB2017	0,16	1,19	7,58	>100*
* sin meseta superior				

TABLA 7 Cambio de EC50 veces en comparación con condición sin CEA desprendido (0 µg/mL)

	sCEA µg/mL			
	0	0,2	1	5
AB17L3-1/N	1,0	3,2	5,0	11,0
AB54L3-1/N	1,0	0,9	4,6	5,7
AB60L3-1/N	1,0	0,9	0,8	1,3
AB66L3-1/N	1,0	1,2	2,1	3,1
AB71L3-1/N	1,0	0,6	4,2	5,5
AB72L3-1/N	1,0	1,2	2,4	7,3
AB73L3-1/N	1,0	0,8	2,9	7,4
Y4L3-1/N	N/A	N/A	N/A	N/A
TCB2014	1,0	0,3	10,0	53,4*
TCB2017	1,0	7,7	48,7	>642,7*
* sin meseta superior				

5

Se encontraron desplazamientos significativamente mayores de EC50 para la destrucción de células tumorales al añadir sCEA para TCB2014 y TCB2017 en comparación con los anticuerpos biespecíficos de la invención a 1 y 5 µg/mL de sCEA. Se encuentran concentraciones de 1 µg/mL y superiores de sCEA en pacientes con tumores CEA positivos. El menor desplazamiento debido a sCEA de las curvas de destrucción de bsAb de la invención sugiere una menor influencia inhibidora de los niveles elevados de sCEA en la eficacia de bsAb de la invención en comparación con TCB2014 y TCB2017.

10

g) TDCC de poblaciones de células sanguíneas primarias CEACAM5 negativas

15

Dado el mecanismo de acción de anticuerpos biespecíficos CEAxCD3, la reactividad cruzada con otros CEACAM podría conducir a la depleción de poblaciones importantes de células sanas circulantes. Por ejemplo, la reactividad cruzada con CEACAM8, que se expresa por neutrófilos, podría conducir a la depleción de tales poblaciones celulares. Para confirmar la ausencia de unión y, por lo tanto, de destrucción de tales poblaciones de células sanas circulantes CEA negativas, se utilizan células primarias purificadas como neutrófilos como "células diana" en lugar de líneas celulares CEA positivas en el procedimiento experimental descrito en el Ejemplo 8a.

20

Ejemplo 9: Evaluación de la actividad antitumoral de la molécula de redirección de células T CEAxCD3 como agente único o en terapia combinada con anticuerpos dirigidos a CD47 en modelos tumorales de ratón humanizados

25

a) Actividad antitumoral de moléculas de CEAxCD3 en modelo tumoral de ratón humanizado PBMC En ratones NOG (ratones NOD/Shi-scid/OL-2R^{Y^{null}}, Taconic Biosciences), de 8-10 semanas de edad, se implantan por vía subcutánea (s.c.) 1 a 5×10⁶ células tumorales CEA positivas (derivadas de línea celular o derivadas de paciente) y se aleatorizan en varios grupos de tratamiento. De cuatro a siete días después, se inyecta a todos los ratones i.p. o i.v. 10 o 20×10⁶ de PBMC humanas (células mononucleares de sangre periférica) para el proceso de humanización. A continuación se administran moléculas o controles CD3xCEA por vía intravenosa a partir de 3-6 días después de la inyección de PBMC, una o dos veces por semana a diferentes dosis. Los ratones se controlan 3 veces por semana para el desarrollo tumoral y los tumores se miden con un calibrador digital hasta el punto final del experimento (volumen tumoral = 1500 mm³ o el inicio de síntomas de GvHD). El volumen tumoral se calcula mediante la fórmula (longitud × anchura²) × 0,5. El análisis estadístico se realiza mediante un análisis comparativo de ANOVA de una vía al terminar el estudio. En la Figura 19 se muestran los resultados de un experimento en el que se injertaron 1 millón de células HPAF-II por vía subcutánea en ratones NOG con posterior inyección de 10 millones de PBMC humanas.

- 5 b) Actividad antitumoral de moléculas de CEAxCD3 en modelo tumoral de ratón humanizado CD34⁺ En ratones CD34⁺-huNOG completamente humanizados (ratones NOD/Shi-scid/OL-2Ry^{null} injertados con CD34⁺, Taconic Biosciences), de 14 semanas de edad y con células CD45⁺ humanas > 25 % en sangre, se implantan por vía subcutánea (s.c.) 1 a 5×10⁶ células tumorales CEA positivas (derivadas de línea celular o derivadas de paciente) y se aleatorizan en varios grupos de tratamiento. Cuando el volumen tumoral medio alcanza un valor predefinido (que oscila entre 100 y 200mm³), se administran moléculas de CD3xCEA o controles i.v., una o dos veces por semana a diferentes dosis. Los ratones se controlan 3 veces por semana para el crecimiento tumoral y los tumores se miden con un calibrador digital hasta el punto final del experimento (volumen tumoral = 1500 mm³). El volumen tumoral se calcula mediante la fórmula (longitud × anchura²) × 0,5. El análisis estadístico se realiza mediante un análisis comparativo de ANOVA de una vía al terminar el estudio.
- 10 c) Actividad antitumoral de moléculas de CEAxCD3 en combinación con anticuerpos dirigidos a CD47 (monoespecíficos o biespecíficos) en modelo tumoral de ratón humanizado Las combinaciones de un anticuerpo biespecífico de esta invención con un mAb anti CD47 (como se describe en el documento de patente US20140140989 y en el documento de patente WO2017196793) o con un anticuerpo biespecífico CEAxCD47 (descrito en el documento de patente PCT/IB2019/054559) pueden probarse en los modelos descritos anteriormente. Se añaden condiciones de prueba adicionales al diseño experimental, incluyendo grupos de tratamiento donde se administra un anticuerpo dirigido a CD47 (monoespecífico o biespecífico) i.v. solo o en combinación con un anticuerpo CEAxCD3 de la presente invención, una o dos veces por semana a diferentes dosis.
- 15 d) Actividad antitumoral de moléculas de CEAxCD3 en combinación con anticuerpos dirigidos a CD47 (monoespecíficos o biespecíficos) en modelos tumorales de ratón transgénicos Las combinaciones de un anticuerpo biespecífico de esta invención con un mAb anti CD47 (como se describe en el documento de patente US20140140989 y en el documento de patente WO2017196793) o con un anticuerpo biespecífico CEAxCD47 (descrito en el documento de patente PCT/IB2019/054559) se pueden probar en ratones transgénicos diseñadas para expresar CD3 humano, CD47 humano y SIRPa humano, que se implantan por vía subcutánea (s.c.) con 0,5 a 5×10⁶ células tumorales murinas diseñadas para expresar CEA humano y CD47 humano. Cuando el volumen tumoral alcanza un valor predefinido (que oscila entre 100 y 200mm³), los ratones se aleatorizan. Los tratamientos se administran i.v., una o dos veces por semana a diferentes dosis. Los ratones se controlan 3 veces por semana para el crecimiento tumoral y los tumores se miden con un calibrador digital hasta el punto final del experimento (volumen tumoral = 1500 mm³). El volumen tumoral se calcula mediante la fórmula (longitud × anchura²) × 0,5. El análisis estadístico se realiza mediante un análisis comparativo de ANOVA de una vía al terminar el estudio.
- 20 30 35

Ejemplo 10: Liberación de citocinas probadas en sangre completa y PBMC de sangre humana de donantes humanos sanos

- 40 Se realiza un ensayo de liberación de citocinas *in vitro* utilizando sangre completa (WB CRA) con dilución mínima por parte de los anticuerpos de prueba (95 % v/v de sangre) en presentación acuosa. Se considera que el formato del ensayo imita fielmente el entorno *in vivo*, ya que contiene factores a concentraciones fisiológicas que pueden influir en los mecanismos de liberación de citocinas. Sin embargo, se cree que este formato es poco predictivo de la liberación de citocinas mediada por linfocitos T (por ejemplo, anti-CD28).
- 45 Alternativamente, el ensayo de liberación de citocinas se puede realizar utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes humanos sanos y con los anticuerpos en presentación acuosa (fase acuosa, AP), para evaluar la liberación de citocinas mediada por células T (PBMC AP CRA). Este formato limita la reticulación de mAbs para evitar la elevada liberación de citocinas que se observa con anticuerpos anti-CD3 en la reticulación.
- 50 55 Los controles negativos (anti-EGFR mAb y PBS), así como los controles positivos específicos (mAb anti-CD52, CEA × CD3 BiTE and/or mAb anti-CD28) para cada formato de ensayo se prueban en paralelo con los anticuerpos biespecíficos CEA × CD3. Después de 24 h para WB CRA y 48 h para PBMC AP CRA, los sobrenadantes se prueban para citocinas en un ensayo multiplex utilizando electroquimioluminiscencia como lectura (Mesoscale Discovery, Sector 600). Se miden IFNy, TNFa y IL-6 para WB CRA y se miden IFNy, IL-2, IL-10 y TNFa para PBMC AP CRA. Los resultados se representan gráficamente por citocina y cada donante se muestra como único punto de datos.

Ejemplo 11 Maduración por afinidad de anticuerpo CEA mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando oligonucleótidos degenerados (optimización de principios activos; LO)

- 60 Los anticuerpos identificados durante el proceso de cribado descrito en el Ejemplo 3 se seleccionan mediante maduración por afinidad para aumentar su afinidad y potencia. Todos estos anticuerpos comparten la misma cadena pesada variable pero tienen diferentes cadenas ligeras variables. AB1 y C11 contienen una cadena ligera kappa (IGKV3-11 y IGKV1-5, respectivamente, según la nomenclatura IMGT), mientras que AB8 y 1B4 contienen una cadena ligera lambda light (IGLV2-14 y IGLV3-21, respectivamente). Varias bibliotecas de fagos que muestran variantes de scFv se generan mediante introducción de diversidad en CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera, mientras que la región variable

de cadena pesada se mantiene sin modificar. Se utilizan diferentes estrategias de diversificación para generar bibliotecas para cada candidato, donde ya sea CDRL1+CDRL2; o solo CDRL3 o los tres CDRLs se diversifican (CDRL1+CDRL2+CDRL3) por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de la secuencia parental utilizando oligonucleótidos degenerados. CDRL1 se diversifica en 1 a 5 posiciones de aminoácidos; CDRL2 en 1 a 4 posiciones de aminoácidos, mientras que CDRL3 en 1 a 5 posiciones de aminoácidos. Para cada candidato se genera un total de 5×10^9 transformantes que cubren parcialmente una diversidad teórica de hasta 10^{14} .

Para los candidatos AB1 y 1B4, se generan bibliotecas adicionales diversificadas en hasta 17 posiciones de aminoácidos en todas las CDRL con hasta 5×10^9 transformantes que cubren parcialmente una diversidad teórica de hasta 10^{21} .

Estas bibliotecas se utilizan para las selecciones de presentación de fagos que se describen en el Ejemplo 2 excepto que la rigurosidad de selección podría aumentarse entre rondas mediante reducción de la concentración de hCEACAMS recombinantes de 100 nM gradualmente a 0,01 nM entre las diferentes rondas de selección o utilizando células que expresan niveles más bajos de hCEACAMS como la línea celular SNUC-1. Se analiza la capacidad de unión a CEACAM5 de las variantes seleccionadas utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 3. Los clones positivos se reformatean como IgG y se caracterizan como se describe en los Ejemplos 4 y 5, respectivamente.

La rama anti-CEA AB1 (SEQ ID NO: 31 a 34) se optimizó en dos ondas de optimización de principios activos sucesivas. La onda 1 dio lugar a las ramas anti-CEA AB13, AB14, AB15, AB17 y AB20. La onda 2 dio lugar a las ramas anti-CEA AB54, AB60, AB66, AB71, AB72 y AB73.

Ejemplo 12: TDCC (citotoxicidad celular dependiente de células T) y/o TDCC más ADCP de organoides derivados de tumores

Los organoides derivados de células tumorales son un modelo traslacional avanzado para probar compuestos de redirección de células T y/o compuestos de redirección de macrófagos y células NK.

Los organoides se preparan según procedimientos estándar (Schütte et al., *Nature Communications* 2017; DOI:10.1038/ncomms14262) y se incuban con compuestos durante un máximo de 8 días en cocultivo con PBMCs y macrófagos generados in vitro. El medio se cambia cada 4 días y se reemplaza por medio fresco.

Los organoides se recogen y se disocian enzimáticamente en células individuales a 37°C durante 5 min utilizando Accutase. Las células se peletizan, se resuspenden en tampón FACS (PBS, 2 % de FBS, EDTA 2 mM) y se filtran a través de un tamiz celular de 400 µm. Las suspensiones de números celulares equivalentes se incuban con anticuerpos contra CD45, CD4, CD8, CEA y CD14 (todos de Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania) durante 30 min en hielo. Para la activación de células vivas se utiliza, se mide y se analiza yoduro de propidio mediante el software FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA).

El sobrenadante de cada pocillo se congela a -80°C para análisis de la actividad de células T mediante ELISA.

Ejemplo 13: TDCC y/o TDCC más ADCP de cortes tisulares tumorales derivados de paciente

Los cortes de tejido tumoral fresco derivados de pacientes son otro modelo traslacional avanzado para probar compuestos de reorientación de células T y/o macrófagos y/o células NK.

Las muestras frescas de tejido tumoral se cortarán según procedimientos estándar publicados anteriormente (Sönnichsen et al., *Clinical Colorectal Cancer*, 17 (2018) e189-e199). En resumen, inmediatamente después de la resección quirúrgica y la primera evaluación patológica macroscópica, las muestras tumorales se cortan en cortes de 350 µm utilizando un picador de tejido ((McIlwain TC752; Campden Instruments, Leicestershire, Inglaterra). A continuación se estandariza el diámetro de corte de tejido mediante el uso de una herramienta de extracción de núcleos de 3 mm (kai Europe, Solingen, Alemania). Se reúnen aleatoriamente tres rodajas de tejido, se colocan sobre insertos de membrana y se cultivan en placas de 6 pocillos. Los cortes se incuban bajo condiciones estandarizadas de 37°C y 5 % de CO₂. El medio se cambia 2 horas y 24 horas después de la preparación antes del tratamiento.

Después de 24 horas de precultivo en medio de cultivo celular estándar, los tripletes de cortes pueden exponerse a anticuerpos biespecíficos según la invención solos o en combinación, respectivamente, durante un máximo de 120 horas. Si es necesario, el tiempo de incubación se reduce a 72 horas. Después de 72 horas se cambiará el medio.

Después de la exposición al compuesto, los cortes de tumor se fijan durante la noche utilizando paraformaldehído al 4%. El sobrenadante de cada pocillo se congelará a -80°C para análisis de la actividad de células T mediante ELISA.

Se embeben rodajas fijadas con paraformaldehído en parafina y se procesan en secciones de 5 µm. La tinción de hematoxilina y eosina (HE) se realiza para evaluar los aspectos histopatológicos y la proporción de células tumorales. El recuento celular general, el recuento de células tumorales y la proliferación se analizan mediante tinción inmunofluorescente. En resumen, se desparafinan secciones de parafina. Después de la extracción de antígeno, las

secciones se lavan con 0,3 % de PBS/TritonX y se bloquean con suero de cabra normal al 5 % (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) durante 30 minutos. Anticuerpos primarios contra citoqueratinas (AE1

b

5 3), Ki67 y PARP escindida, respectivamente, se diluyen en albúmina sérica bovina al 0,5 % y se incuban a 4°C durante la noche. Las secciones se enjuagan con solución salina tamponada con fosfato al 0,3 %/TritonX y se marcan con anticuerpos secundarios. Los núcleos se tiñen con Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para análisis posterior, se incluyen anticuerpos contra CEA (células tumorales), CD163 (macrófagos) y CD3, CD4, CD8, PD-L1, así como FoxP3
10 (todas las células T) dependiendo de la disponibilidad de cortes tumorales.

15 El área que contiene células tumorales se analiza en secciones de HE mediante escaneos de portaojitos (Pannoramic SCAN and Pannoramic Viewer, 3D Histech, Budapest, Hungría) para investigar las diferentes fracciones de células tumorales. Se excluyen del análisis los cortes que contenían más células epiteliales benignas que células epiteliales neoplásicas. Los cortes que no contenían células tumorales se excluyen de análisis de la fracción de células tumorales
20 proliferantes pero se incluyen en el análisis de células tumorales por condición. Para análisis posterior, se toman 5 imágenes (20x) por corte de tejido de secciones teñidas con fluorescentes utilizando un microscopio fluorescente Olympus BX51 (Olympus Deutschland, Hamburgo, Alemania). El recuento de píxeles positivos se determina para las tinciones de Hoechst 33342, citoqueratina, Ki67 y PARP escindido con algoritmos de segmentación específicos de la tinción para la
25 imagen J. El área tumoral proliferante/apoptótica se calcula mediante el análisis de píxeles de núcleos positivos de Ki67/PARP escindido rodeados por píxeles positivos para citoqueratina.

Para cada imagen se calcula el recuento total de células (Hoechst positivo) el recuento de células tumorales (Hoechst y citoqueratina positivo) y el recuento de células tumorales proliferantes (Hoechst, citoqueratina y Ki67 positivo/PARP escindido). El recuento de células tumorales se normaliza con respecto al recuento de células totales y el recuento de células tumorales en proliferación se normaliza con respecto al recuento de células tumorales para considerar diferentes fracciones de células tumorales por imagen. Después, los valores medios de rodajas se calculan a partir de valores de imágenes individuales. Los valores medios de las condiciones se calculan utilizando valores medios de rodajas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende una primera parte de unión, que se une específicamente a CEACAM5 humano, y una segunda parte de unión, que se une específicamente a CD3ε humano, en donde:
 - 5 a) la primera parte de unión comprende una región variable de cadena pesada (VH), que comprende una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, una CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 4,
 - 10 b) la primera parte de unión comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende un conjunto de CDRL seleccionado del grupo que consiste en
 - b1) una CDRL1 de SEQ ID NO: 90, CDRL2 de SEQ ID NO: 91, y CDRL3 de SEQ ID NO: 92,
 - b2) una CDRL1 de SEQ ID NO: 96, CDRL2 de SEQ ID NO: 97, y CDRL3 de SEQ ID NO: 98,
 - 15 b3) una CDRL1 de SEQ ID NO: 99, CDRL2 de SEQ ID NO: 100, y CDRL3 de SEQ ID NO: 101,
 - b4) una CDRL1 de SEQ ID NO: 102, CDRL2 de SEQ ID NO: 103, y CDRL3 de SEQ ID NO: 104,
 - 20 b5) una CDRL1 de SEQ ID NO: 105, CDRL2 de SEQ ID NO: 106, y CDRL3 de SEQ ID NO: 107,
 - b6) una CDRL1 de SEQ ID NO: 108, CDRL2 de SEQ ID NO: 109, y CDRL3 de SEQ ID NO: 110, y
 - 25 b7) una CDRL1 de SEQ ID NO: 111, CDRL2 de SEQ ID NO: 112, y CDRL3 de SEQ ID NO: 113,
 - c) la segunda parte de unión comprende una VH que comprende una CDRH1 de SEQ ID NO: 2, CDRH2 de SEQ ID NO: 3 y CDRH3 de SEQ ID NO: 4, y
 - 30 d) la segunda parte de unión comprende una VL que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 18, CDRL2 de SEQ ID NO: 19, y CDRL3 de SEQ ID NO: 20.
2. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, que comprende
 - a) en la primera parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1,
 - 35 b) en la primera parte de unión una región variable de cadena ligera VL seleccionada del grupo que consiste en
 - b1) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 117,
 - b2) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 119,
 - 40 b3) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 120,
 - b4) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 121,
 - 45 b5) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 122,
 - b6) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 123, y
 - 50 b7) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 124, y
 - c) en la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 17.
- 55 3. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 2, que comprende
 - a) en la primera parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1,
 - 60 b) en la primera parte de unión una región variable de cadena ligera VL seleccionada del grupo que consiste en
 - b1) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 117,
 - b2) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 122, y
 - 65 b3) una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 124, y

- c) en la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera VL de SEQ ID NO: 17.
4. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, que comprende
- 5 a) en la primera parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1,
- b) en la primera parte de unión una seleccionada del grupo que consiste en
- 10 b1) la cadena ligera de SEQ ID NO: 128,
- b2) la cadena ligera de SEQ ID NO: 130,
- b3) la cadena ligera de SEQ ID NO: 131,
- 15 b4) la cadena ligera de SEQ ID NO: 132,
- b5) la cadena ligera de SEQ ID NO: 133,
- 20 b6) la cadena ligera de SEQ ID NO: 134, y
- b7) la cadena ligera de SEQ ID NO: 135, y
- 25 c) en la segunda parte de unión una región variable de cadena pesada VH de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 28.
5. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** comprende una cadena pesada común seleccionada del grupo que consiste en
- 30 a) la cadena pesada de SEQ ID NO: 43,
- b) la cadena pesada de SEQ ID NO: 44, y
- c) la cadena pesada de SEQ ID NO: 45.
- 35 6. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45 y en la segunda parte de unión una cadena ligera de SEQ ID NO: 28 y en la segunda parte de unión una cadena ligera de SEQ ID NO: 128.
- 40 7. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45 y en la segunda parte de unión una cadena ligera de SEQ ID NO: 28 y en la segunda parte de unión una cadena ligera de SEQ ID NO: 133.
- 45 8. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada común de SEQ ID NO: 45 y en la segunda parte de unión una cadena ligera de SEQ ID NO: 28 y en la segunda parte de unión una cadena ligera de SEQ ID NO: 135.
- 50 9. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** comprende un dominio Fc en donde cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329A (numeración del índice de Kabat EU).
10. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de carcinomas in vivo.
- 55 11. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de cáncer mediante administración a un sujeto que padece de cáncer de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición que contiene dicho anticuerpo biespecífico.
- 60 12. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de carcinoma colorrectal, cáncer de esófago, adenocarcinoma de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, carcinoma de cabeza y cuello, cánceres uterino y de vejiga.
- 65 13. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en monoterapia para el tratamiento de tumores sólidos que expresan CEA.

14. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de cáncer en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47 en combinación simultánea, separada o secuencial.
- 5 15. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de cáncer en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47 y/o un antagonista de eje PD-1 en combinación simultánea, separada o secuencial.
- 10 16. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de cáncer en combinación con un antagonista de eje PD-1 en combinación simultánea, separada o secuencial.
- 15 17. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47 para uso en administración alternante, en intervalos de 6 a 15 días entre administración del anticuerpo de la invención y el anticuerpo biespecífico anti-CEAxCD47 en el tratamiento de cáncer.
- 20 18. El anticuerpo biespecífico para uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en donde el anticuerpo se administra al paciente en dosis que oscilan entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis únicas o divididas, o por infusión continua.
- 25 19. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 18, **caracterizado por que** el anticuerpo de la invención se administra a un paciente en dosis que oscilan entre 1 y 20 mg/kg.
- 20 20. El anticuerpo biespecífico para uso según cualquiera de las reivindicaciones 14, 15 o 17, **caracterizado por que** el anticuerpo anti-CEAxCD47 se administra al paciente en dosis que oscilan entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis únicas o divididas, o por infusión continua.
- 30 21. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 16, en donde el antagonista de eje PD-1 se administra al paciente en dosis que oscilan entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis únicas o divididas, o por infusión continua.
- 35 22. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
23. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un fragmento del mismo que se une al antígeno.
24. Un vector que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 23.
25. Una célula que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 23 o el vector de la reivindicación 24.

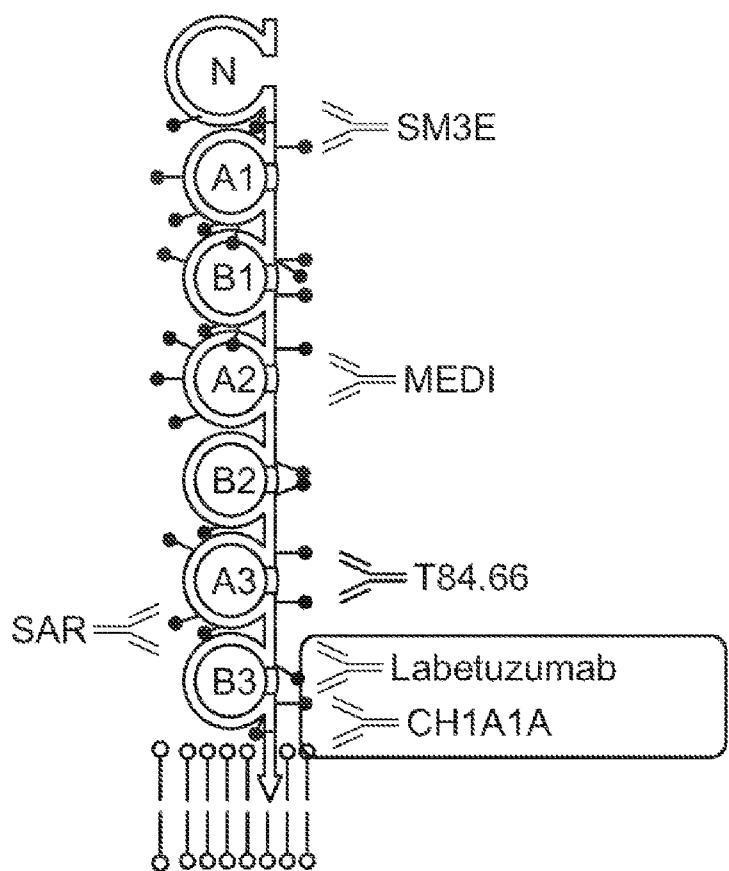


Fig. 1

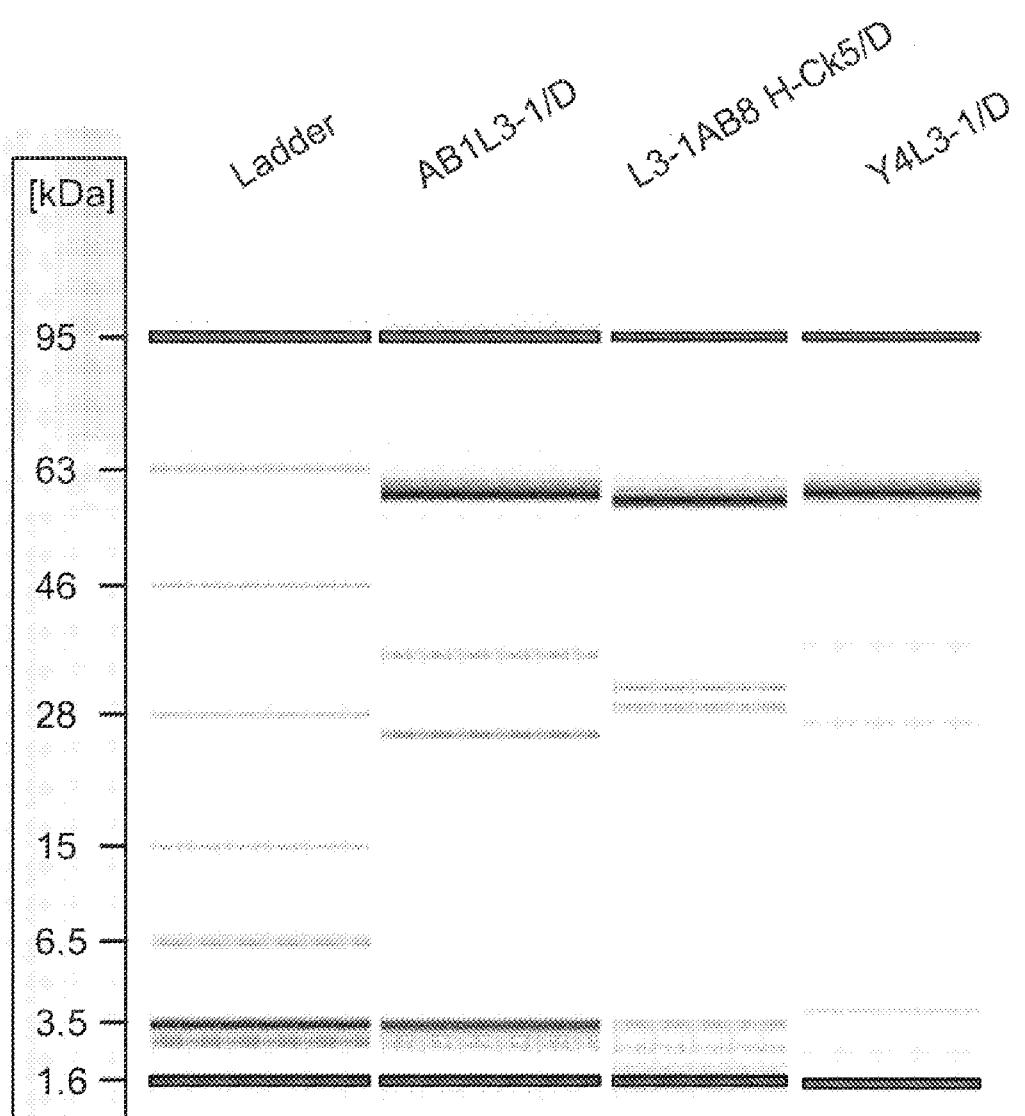


Fig. 2

TIB-153

Jurkat

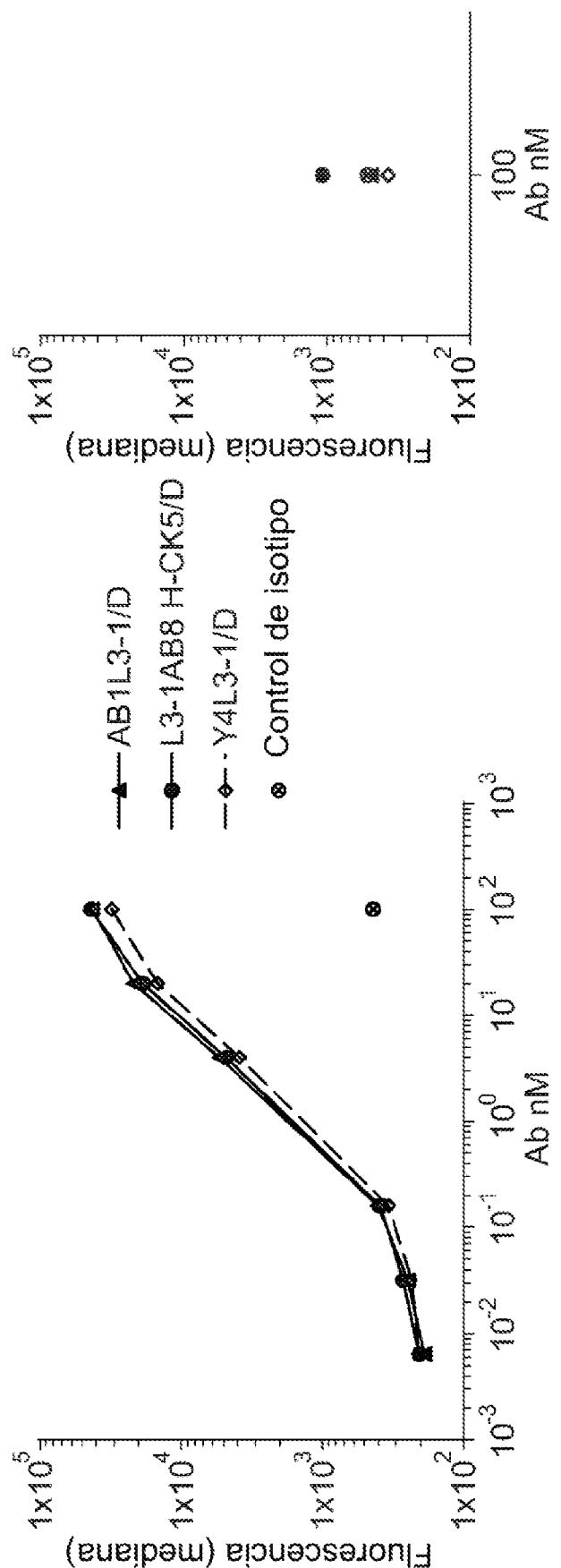


Fig. 3

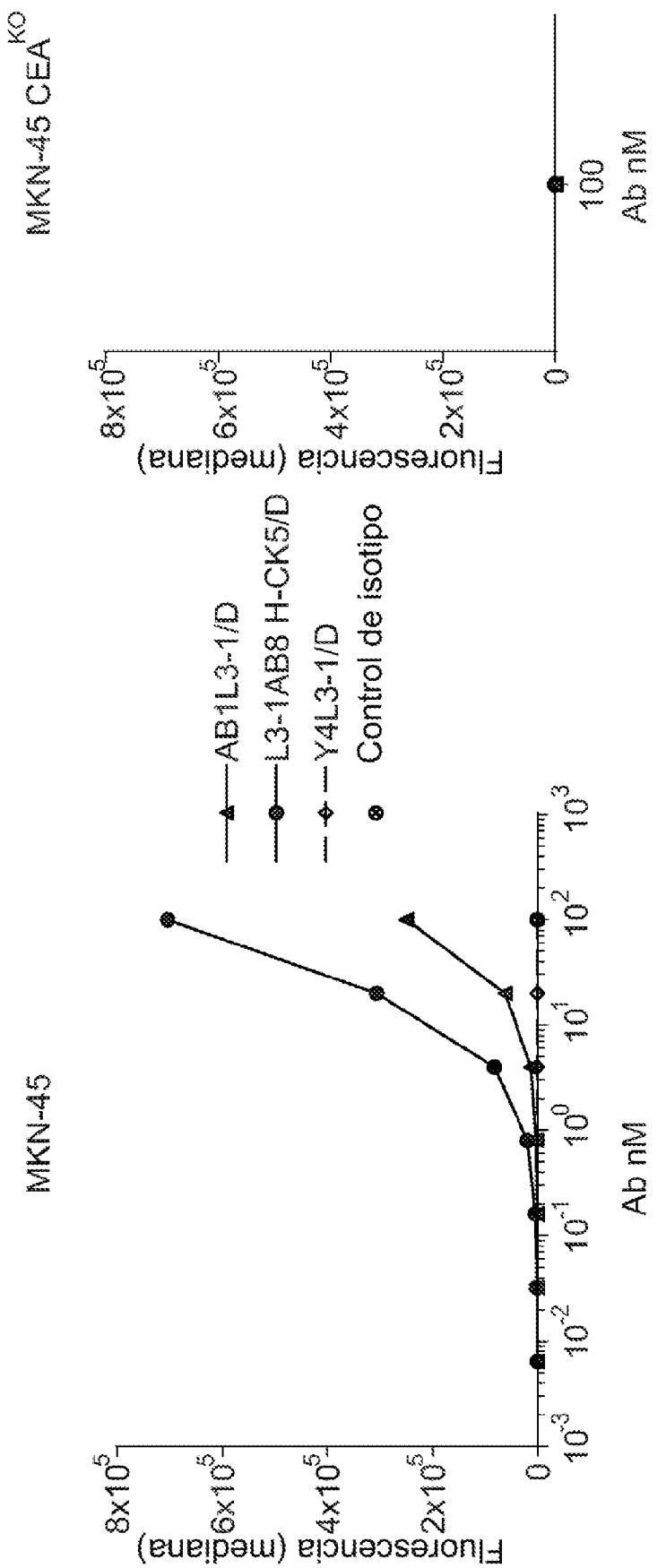


Fig. 4

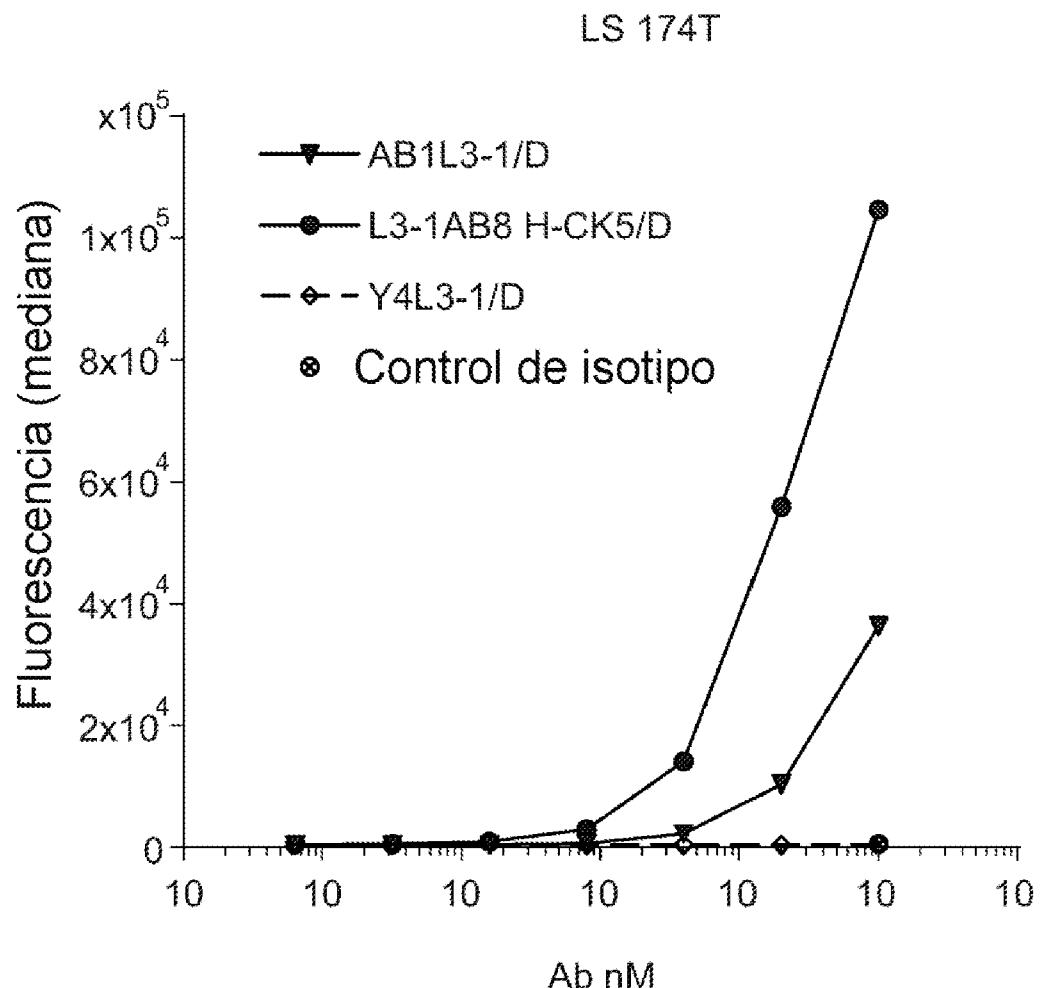


Fig. 5

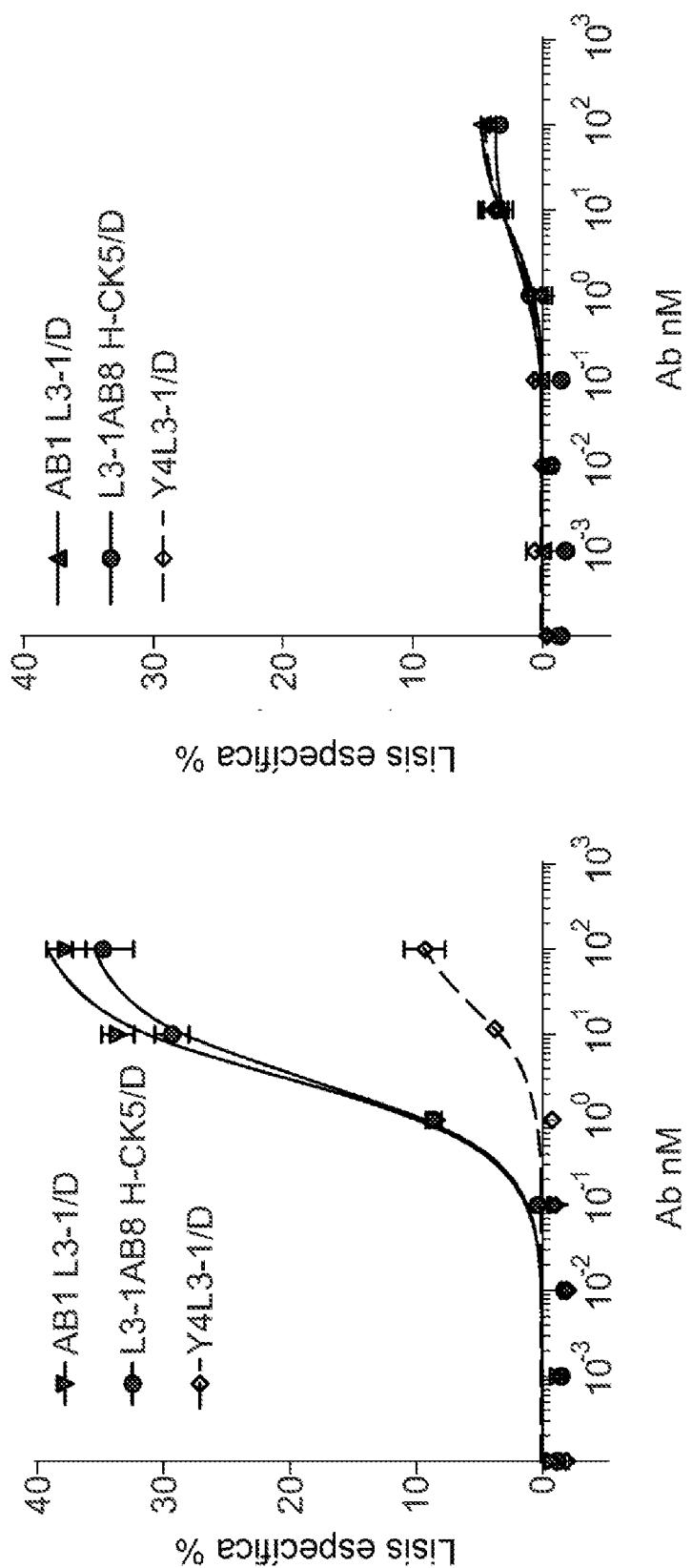


Fig. 6

Ls-174T

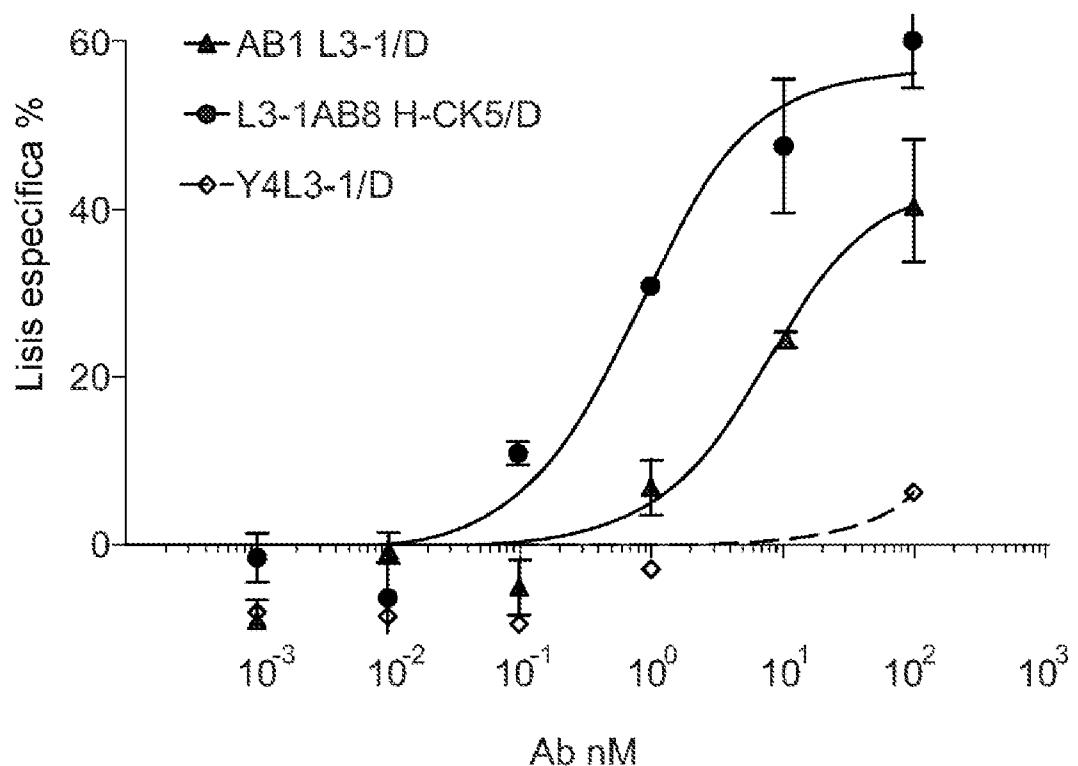


Fig. 7

1B4 mAb

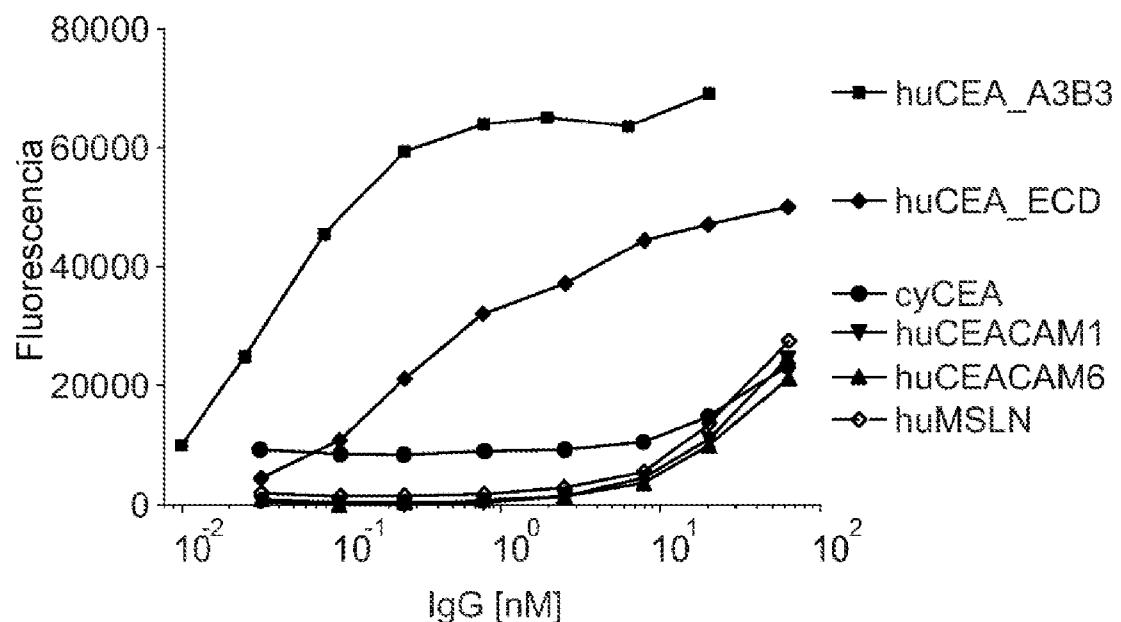


Fig. 8

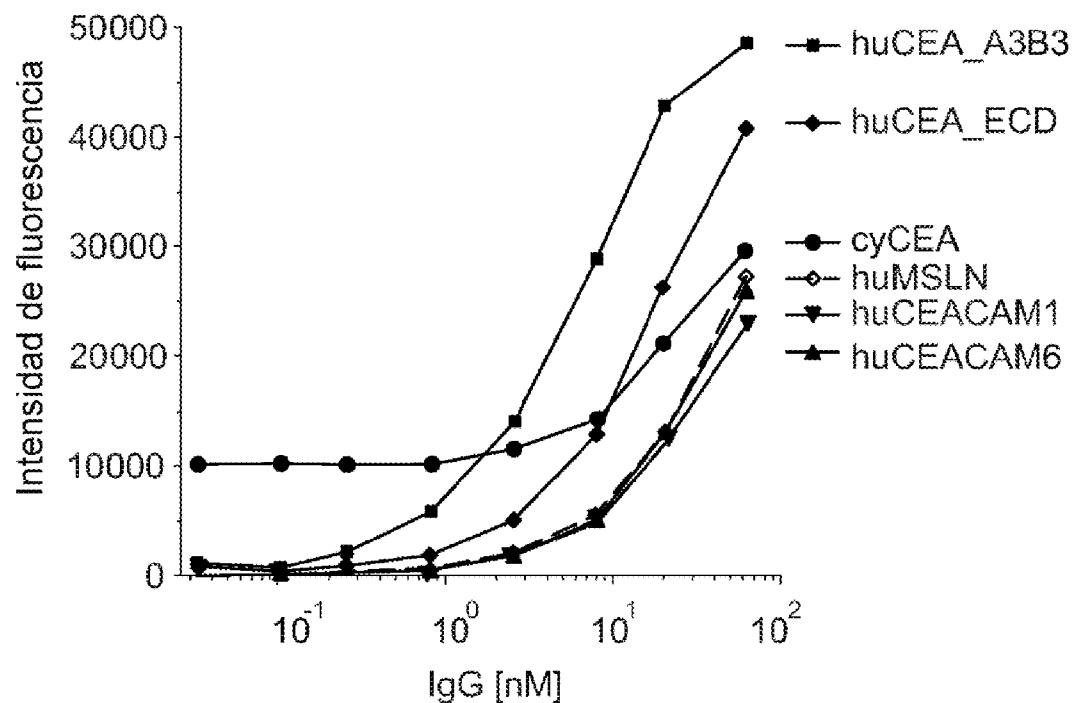


Fig. 9

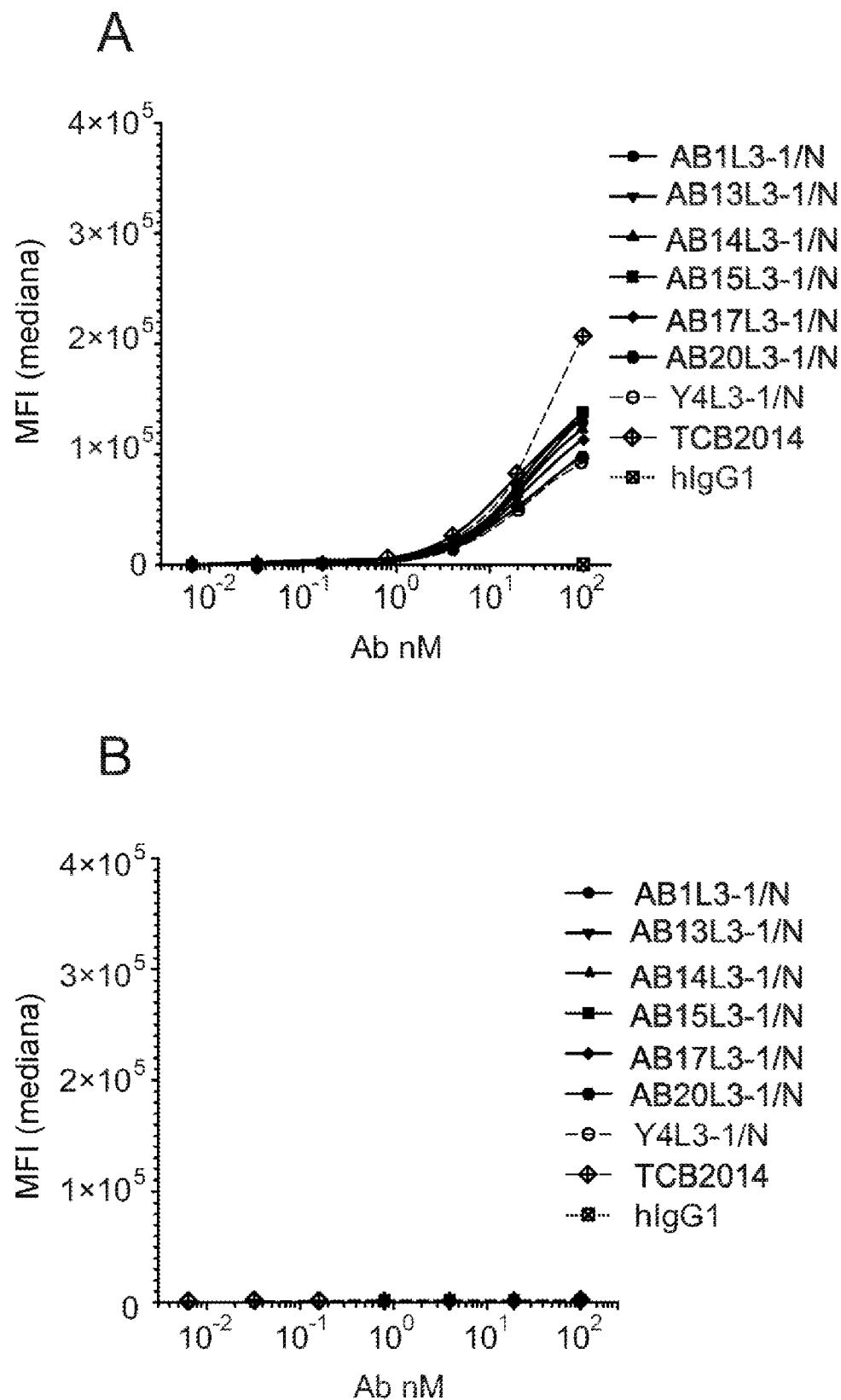


Fig. 10

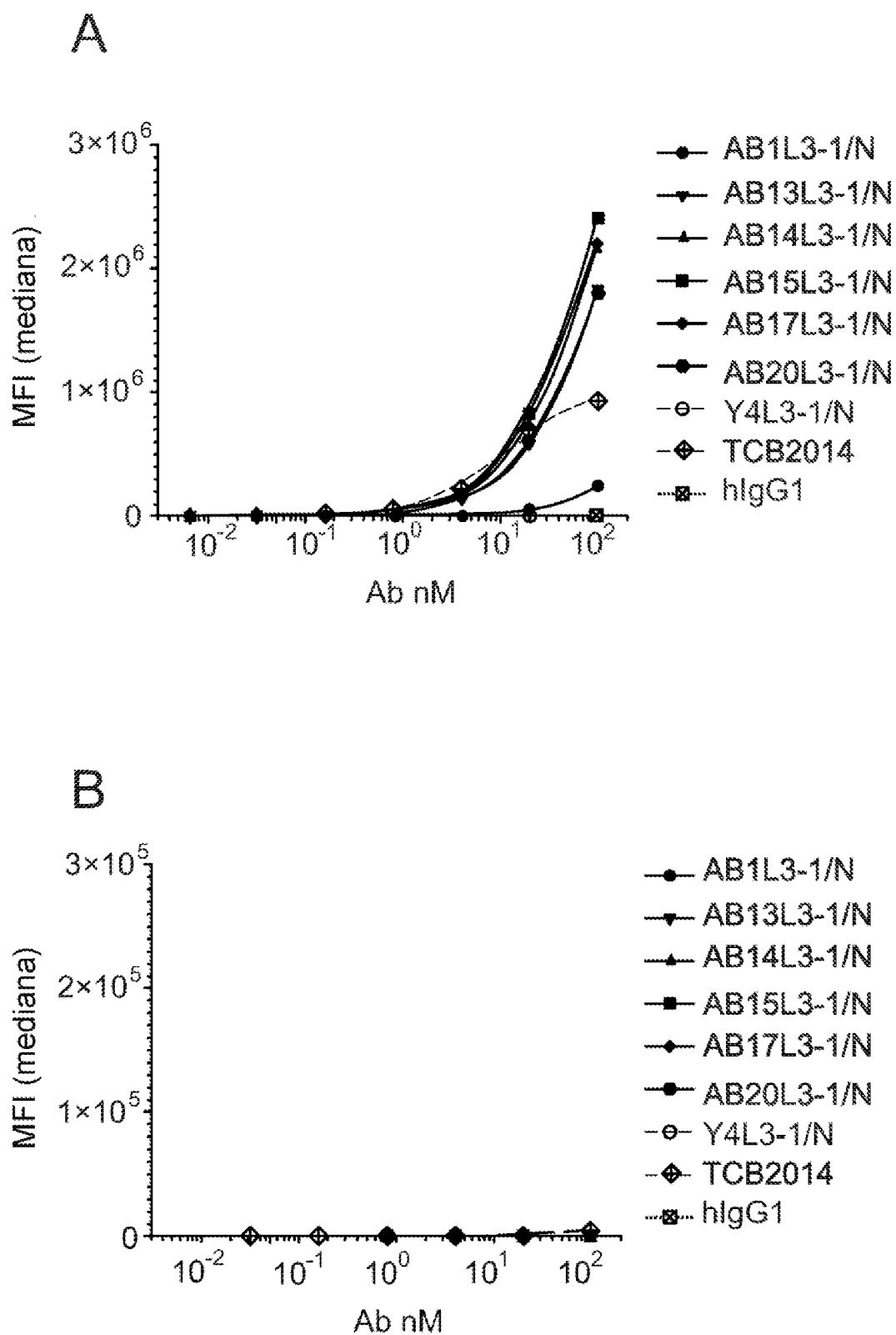


Fig. 11

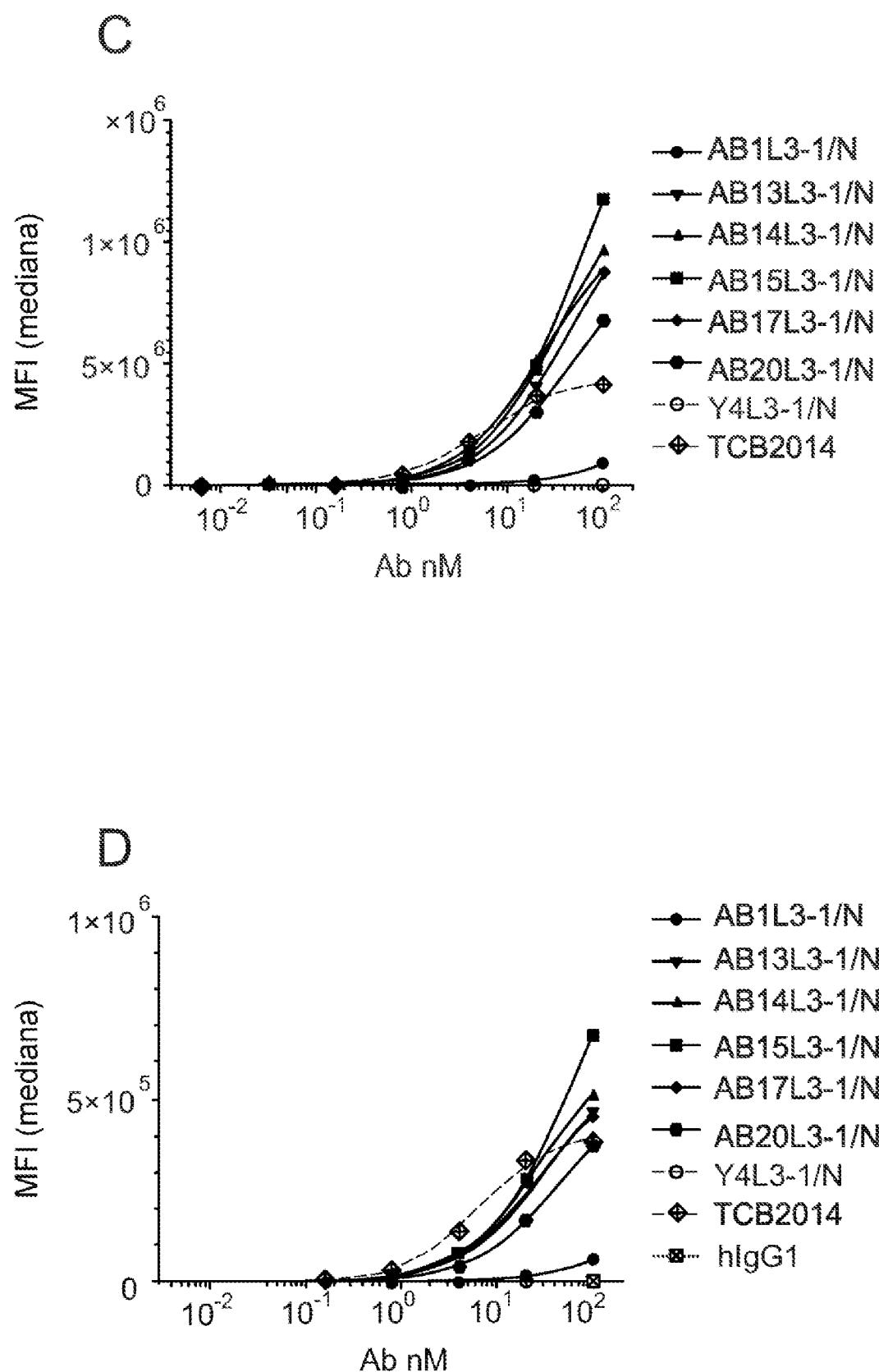


Fig. 11 (continuación)

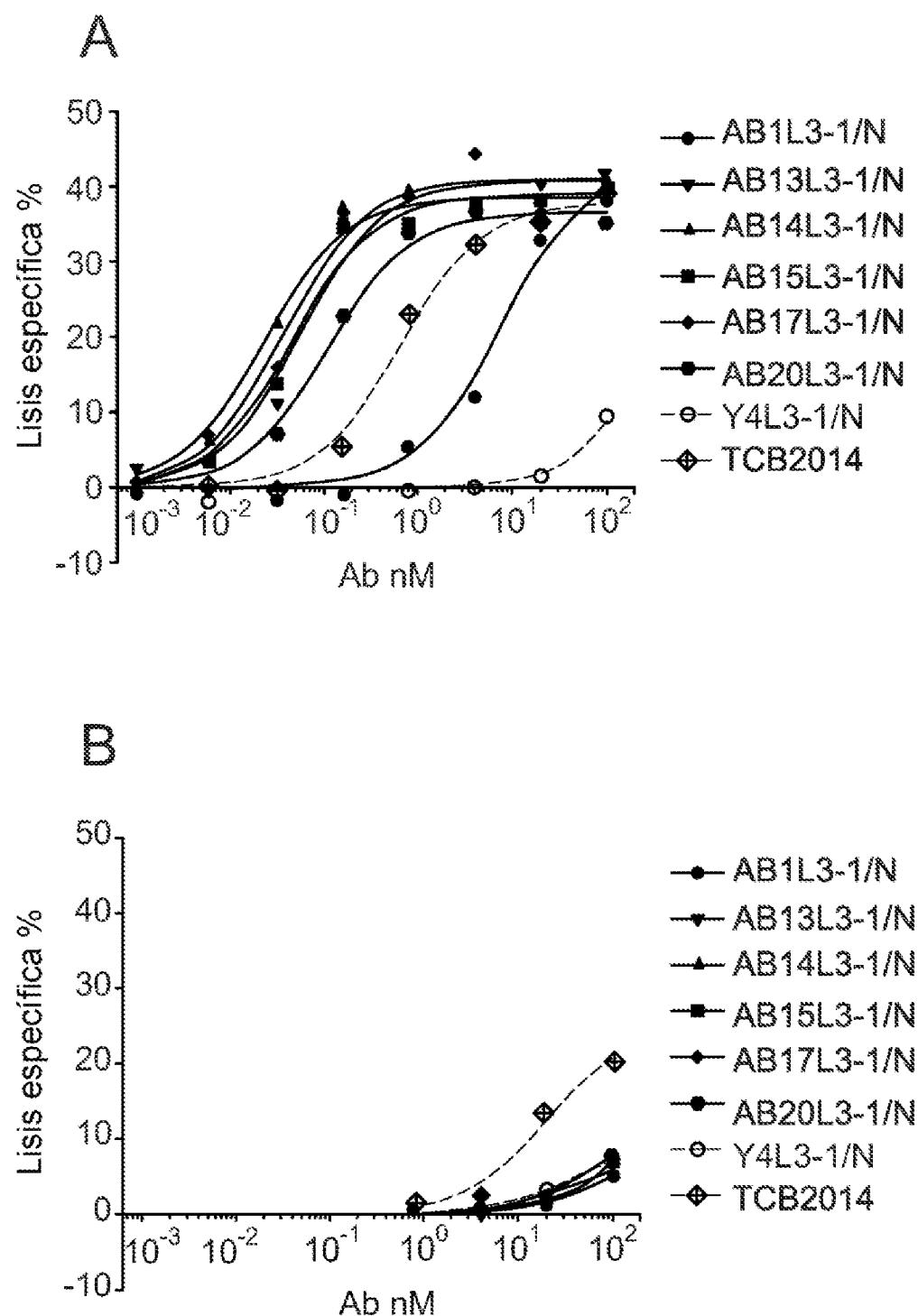


Fig. 12

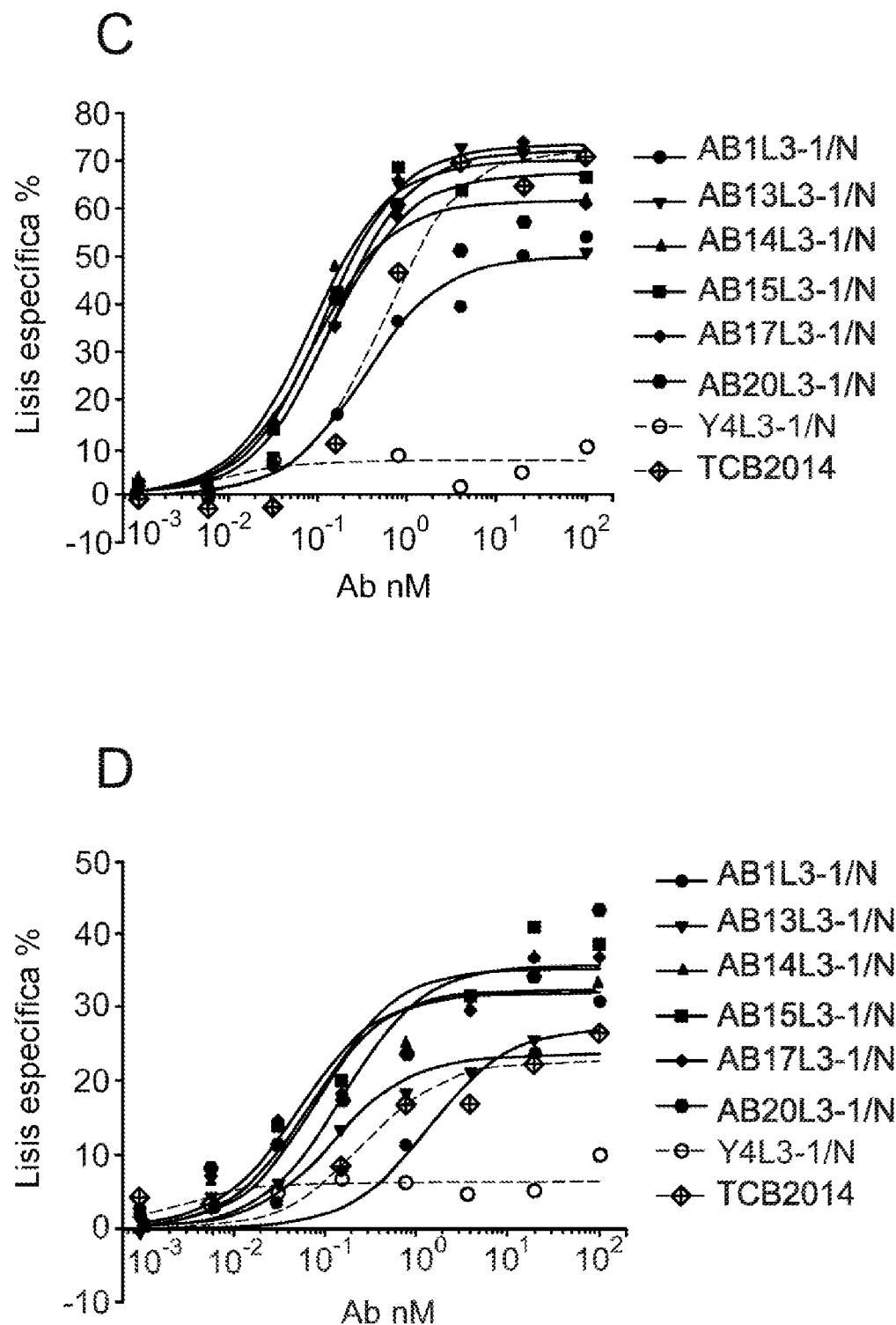


Fig. 12 (Continuación)

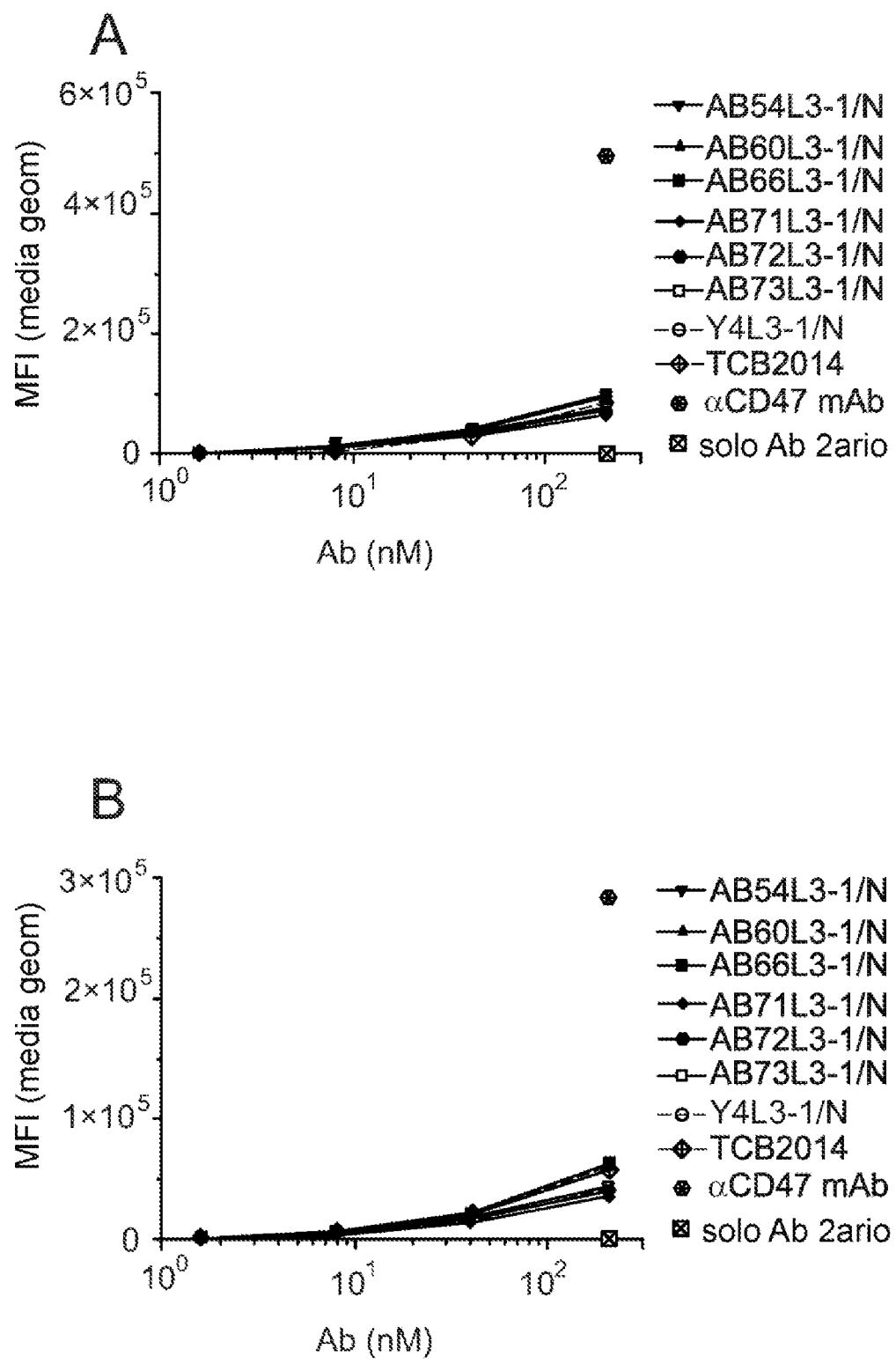
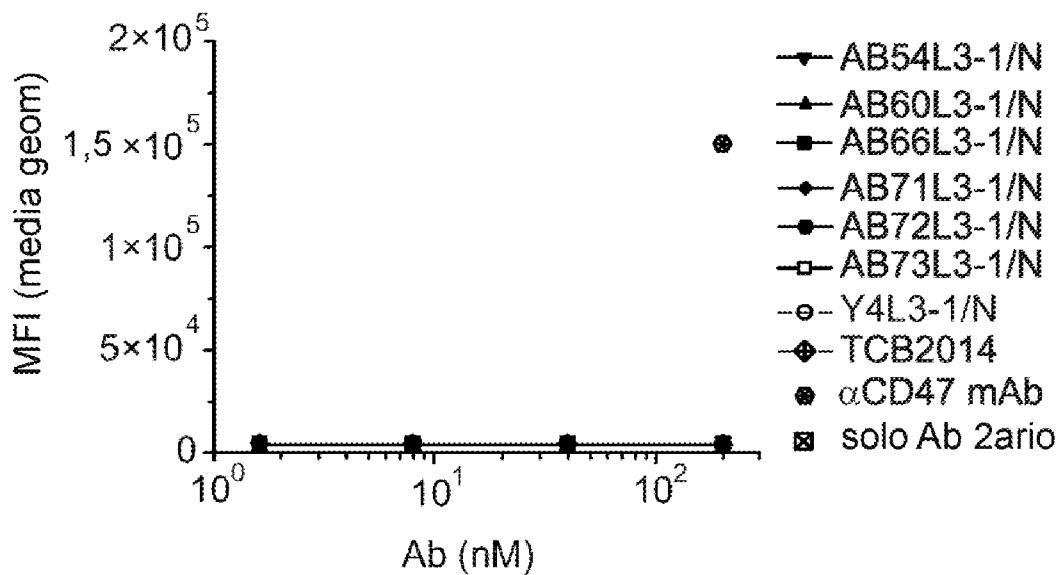


Fig. 13

C



D

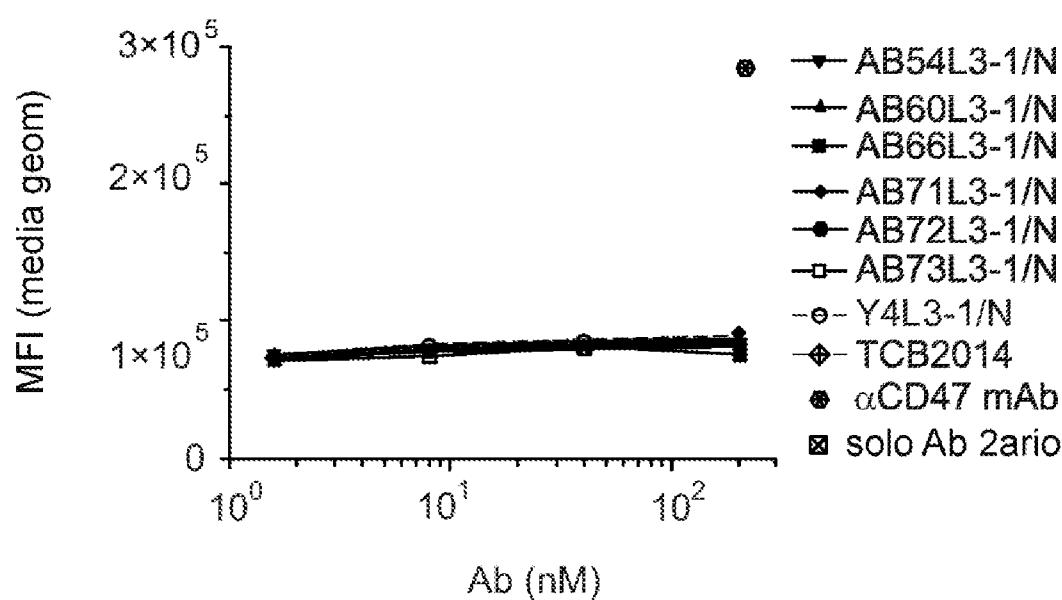


Fig. 13 (continuación)

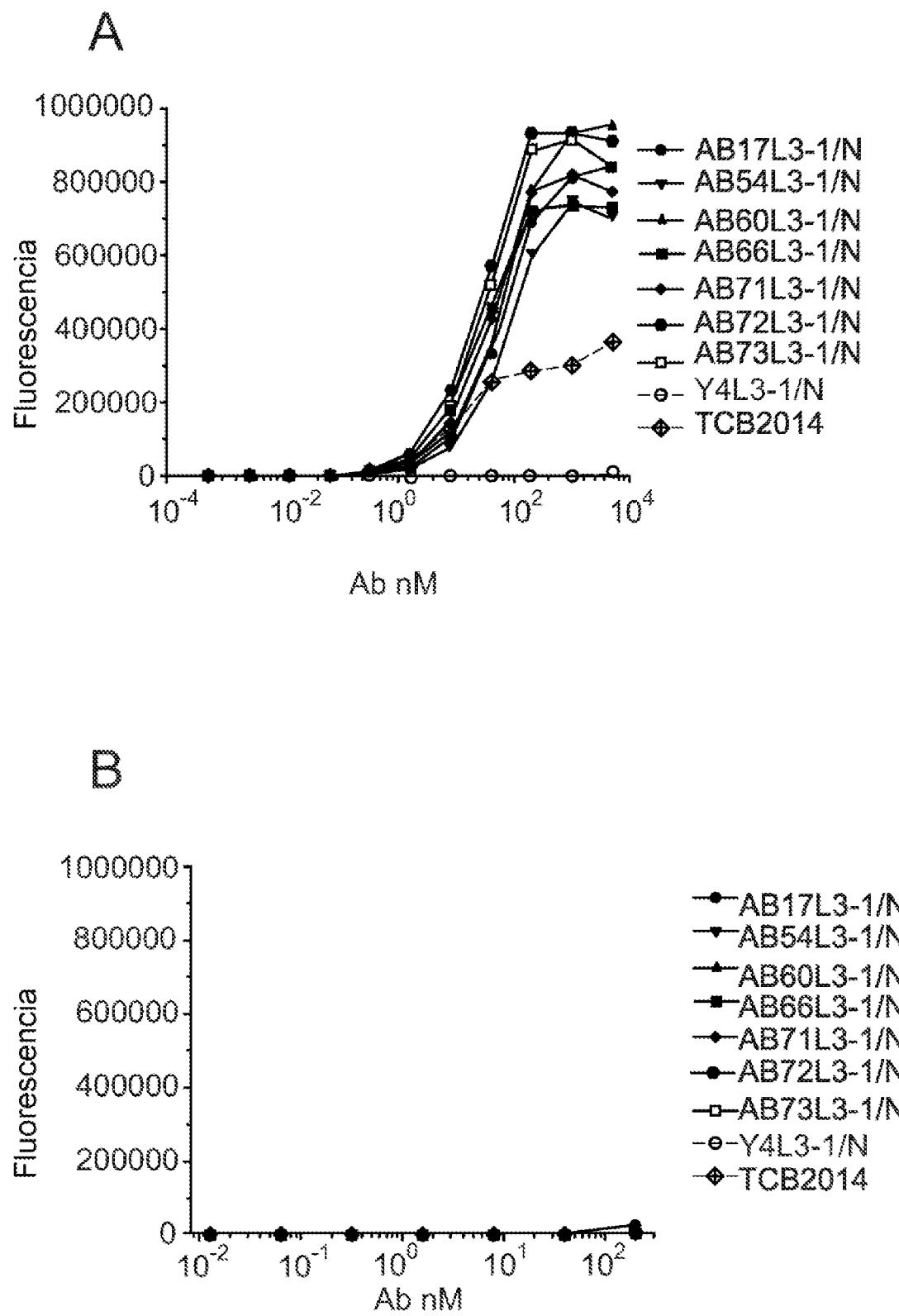


Fig. 14

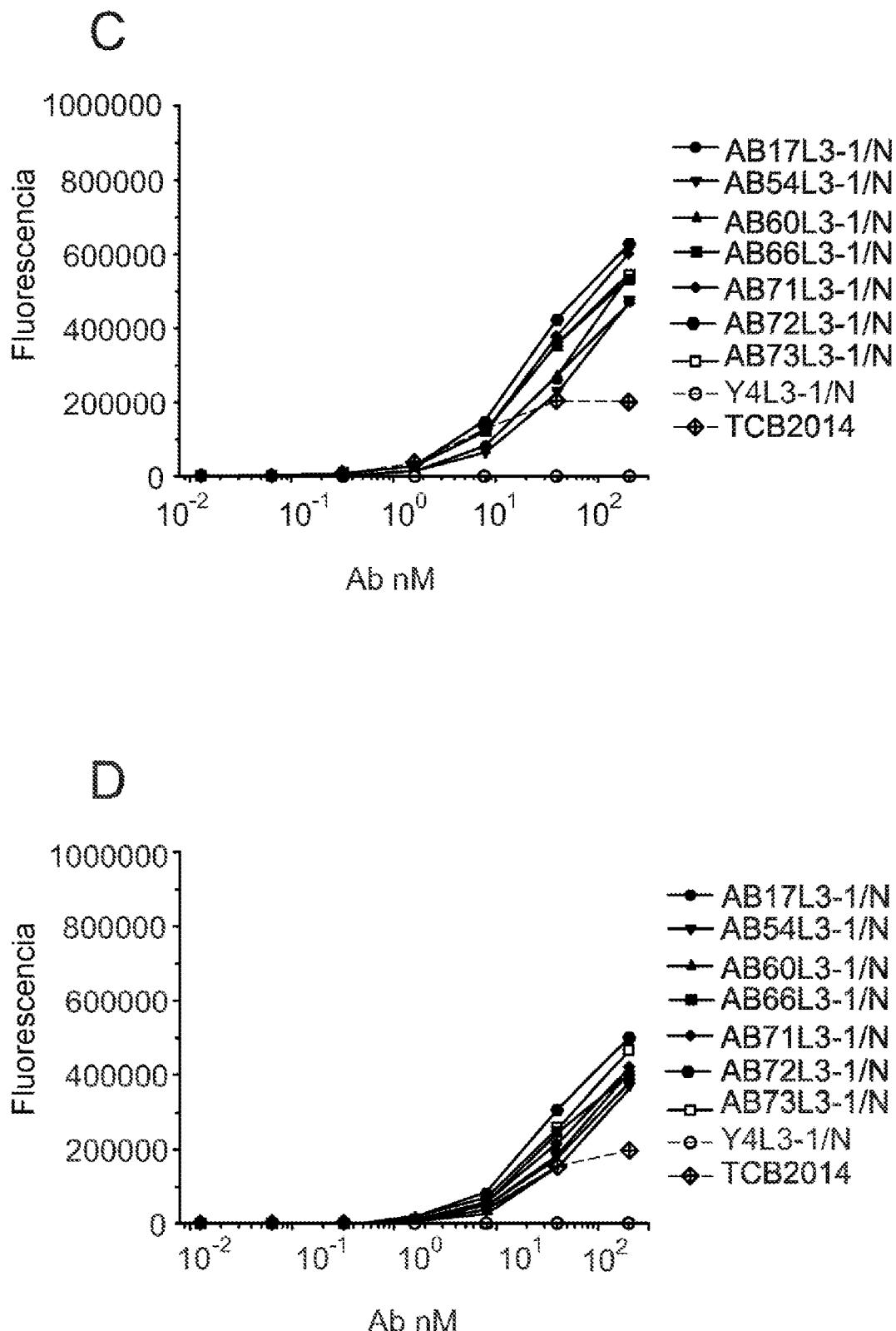


Fig. 14 (continuación)

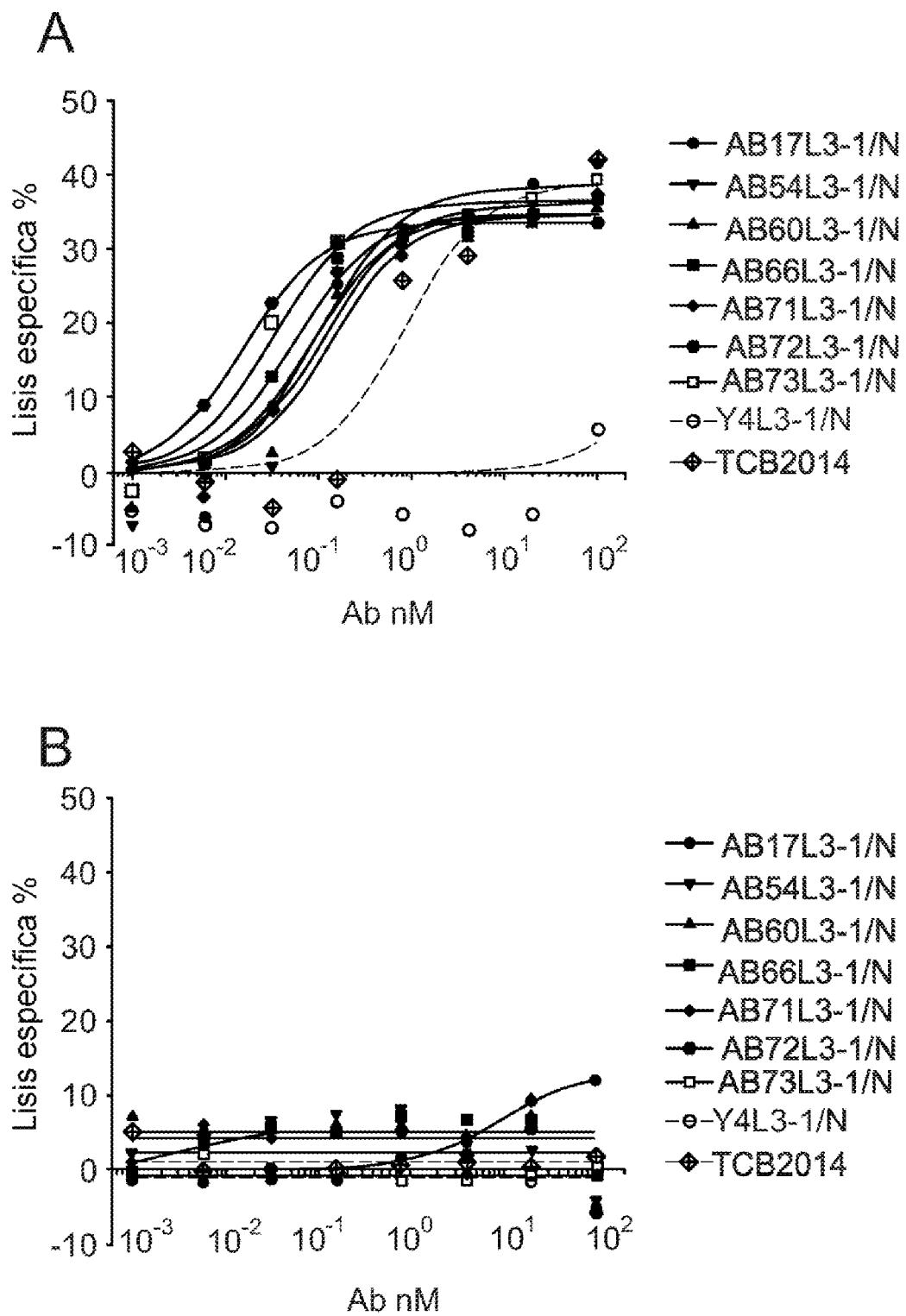


Fig. 15

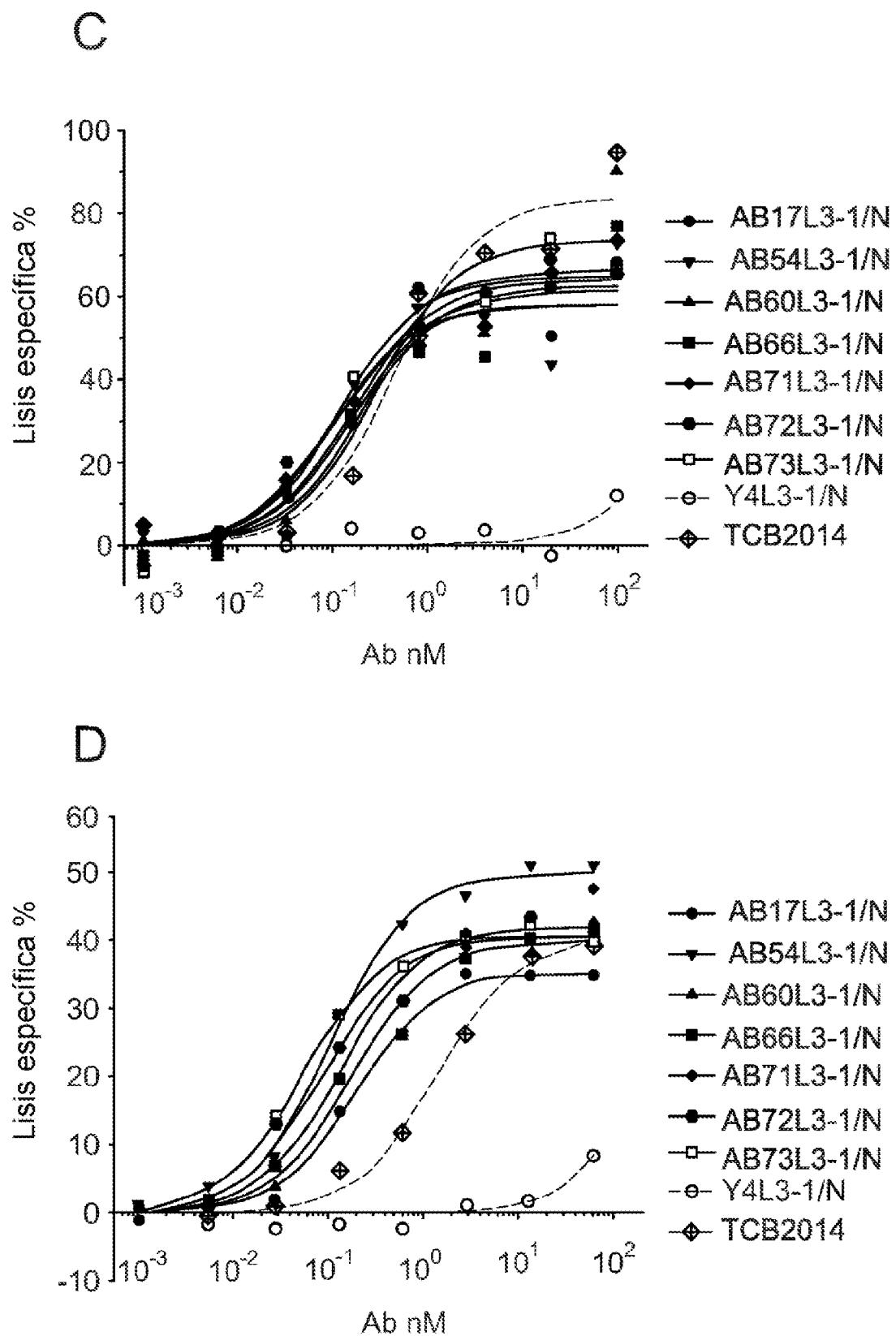


Fig. 15 (continuación)

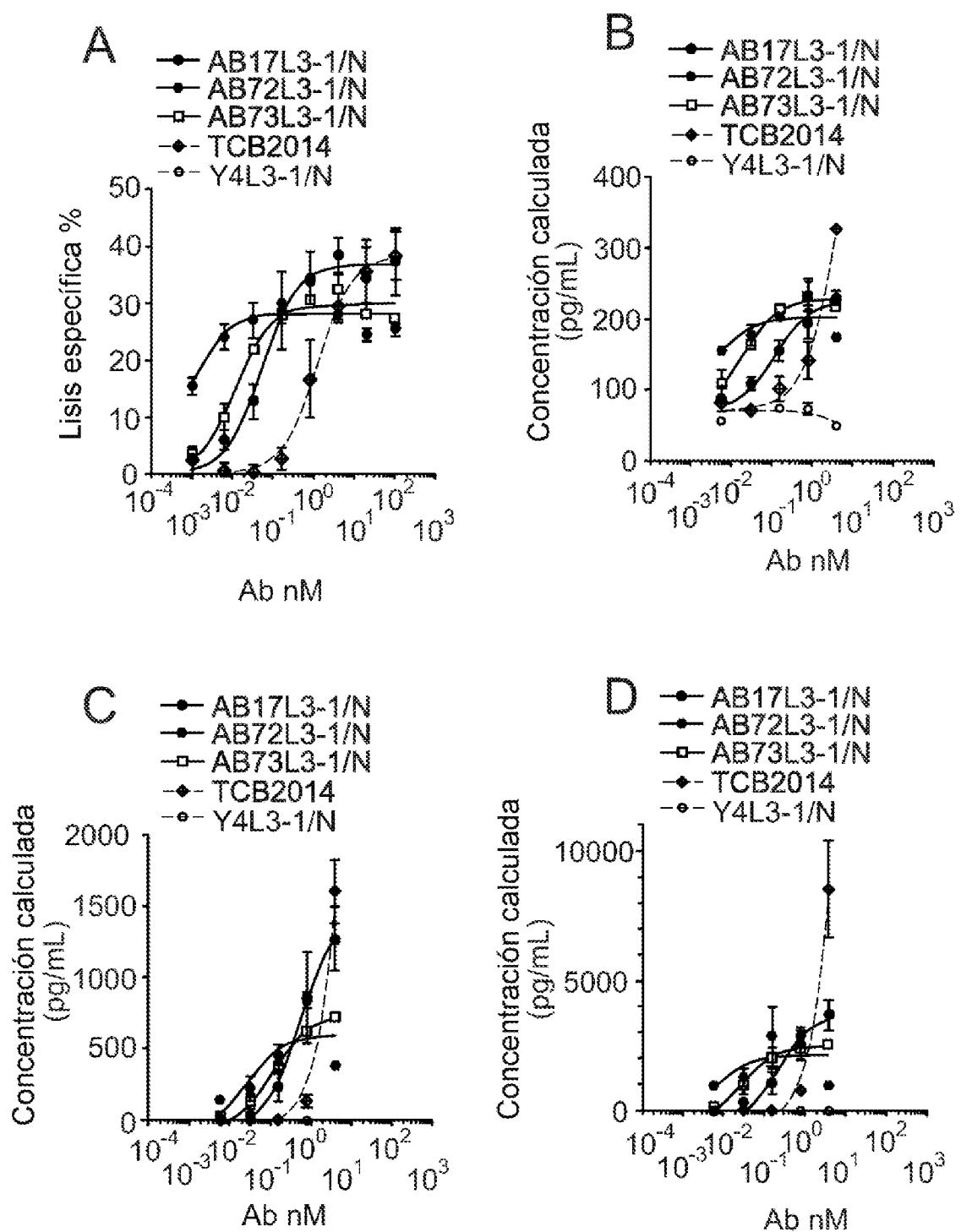


Fig. 16

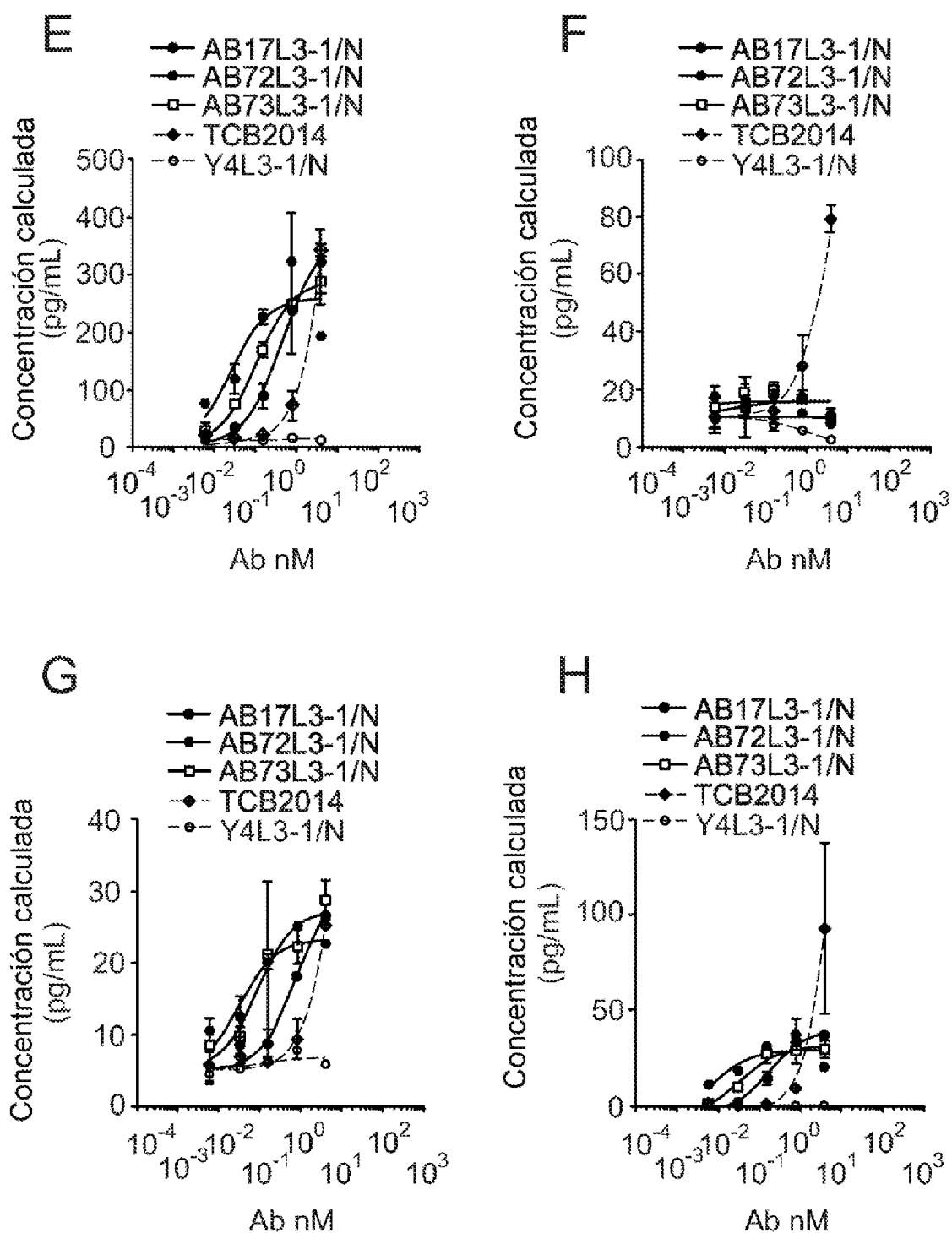


Fig. 16 (continuación)

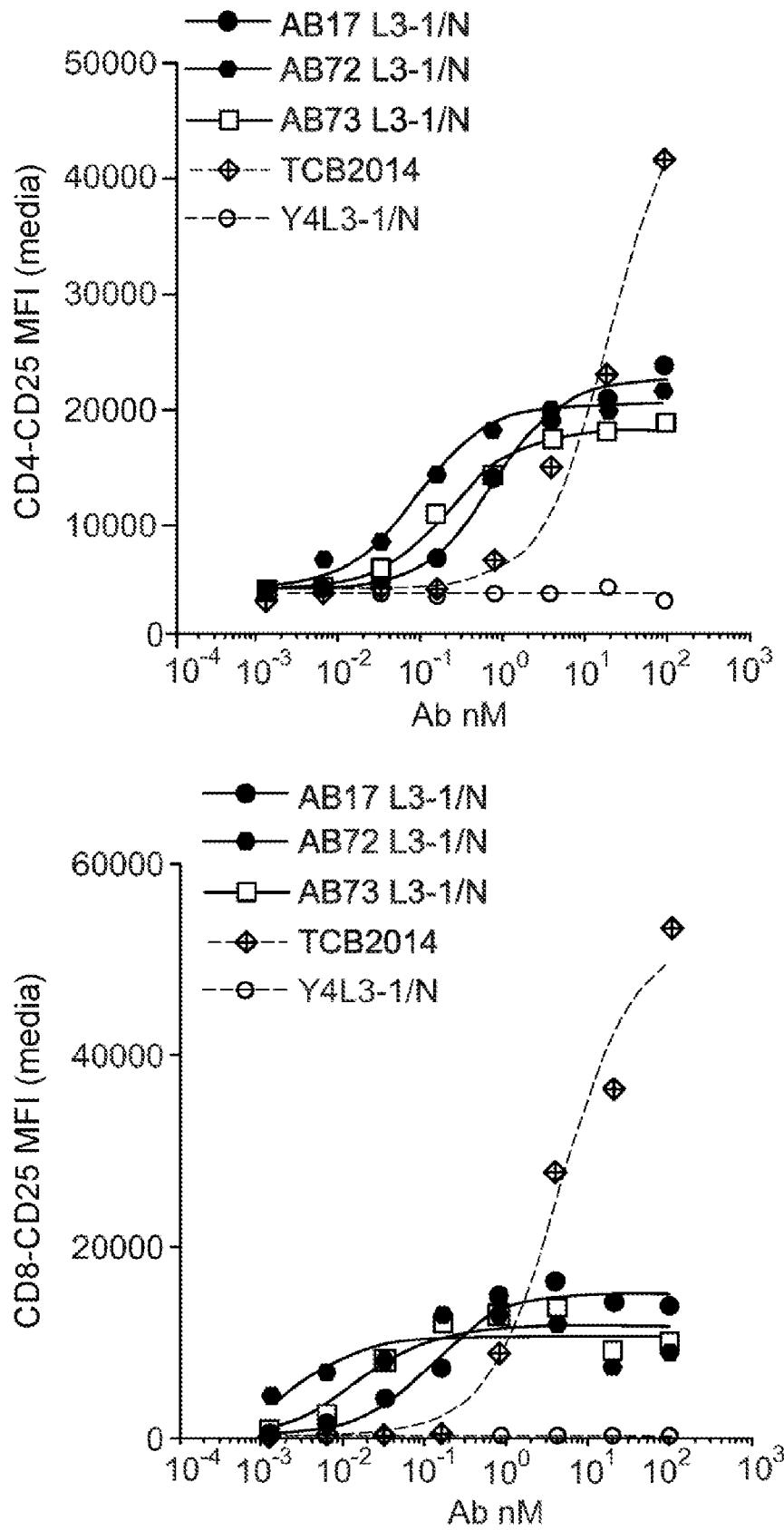


Fig. 17

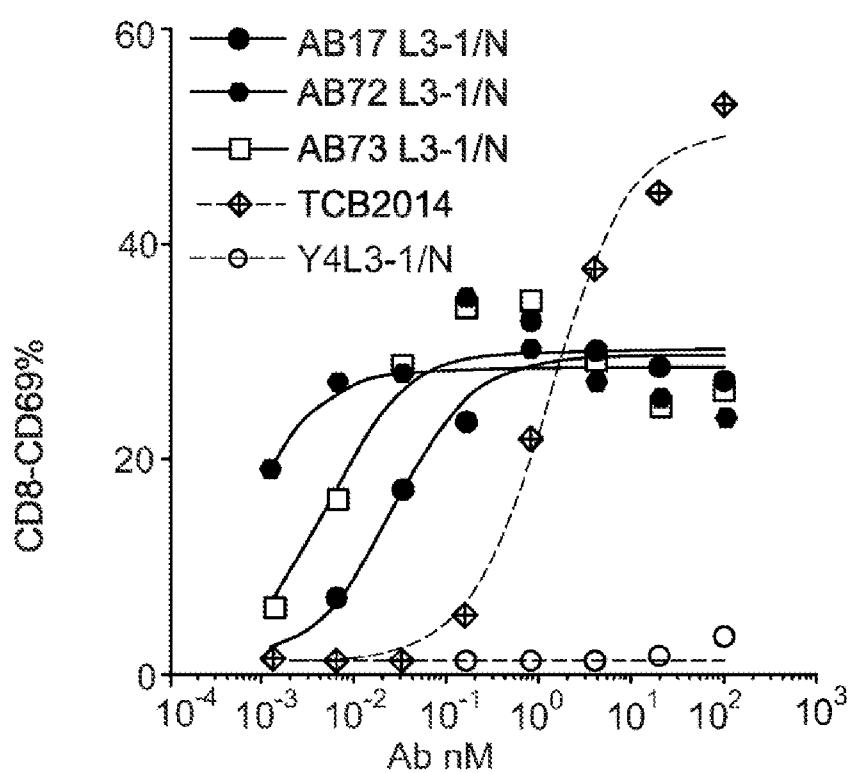
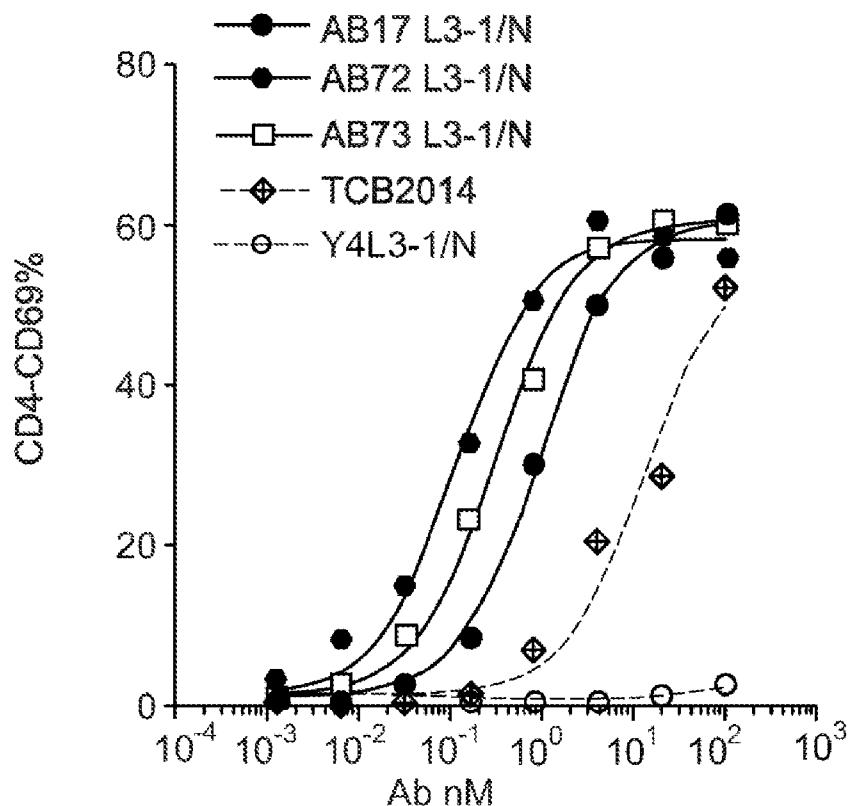


Fig. 17 (continuación)

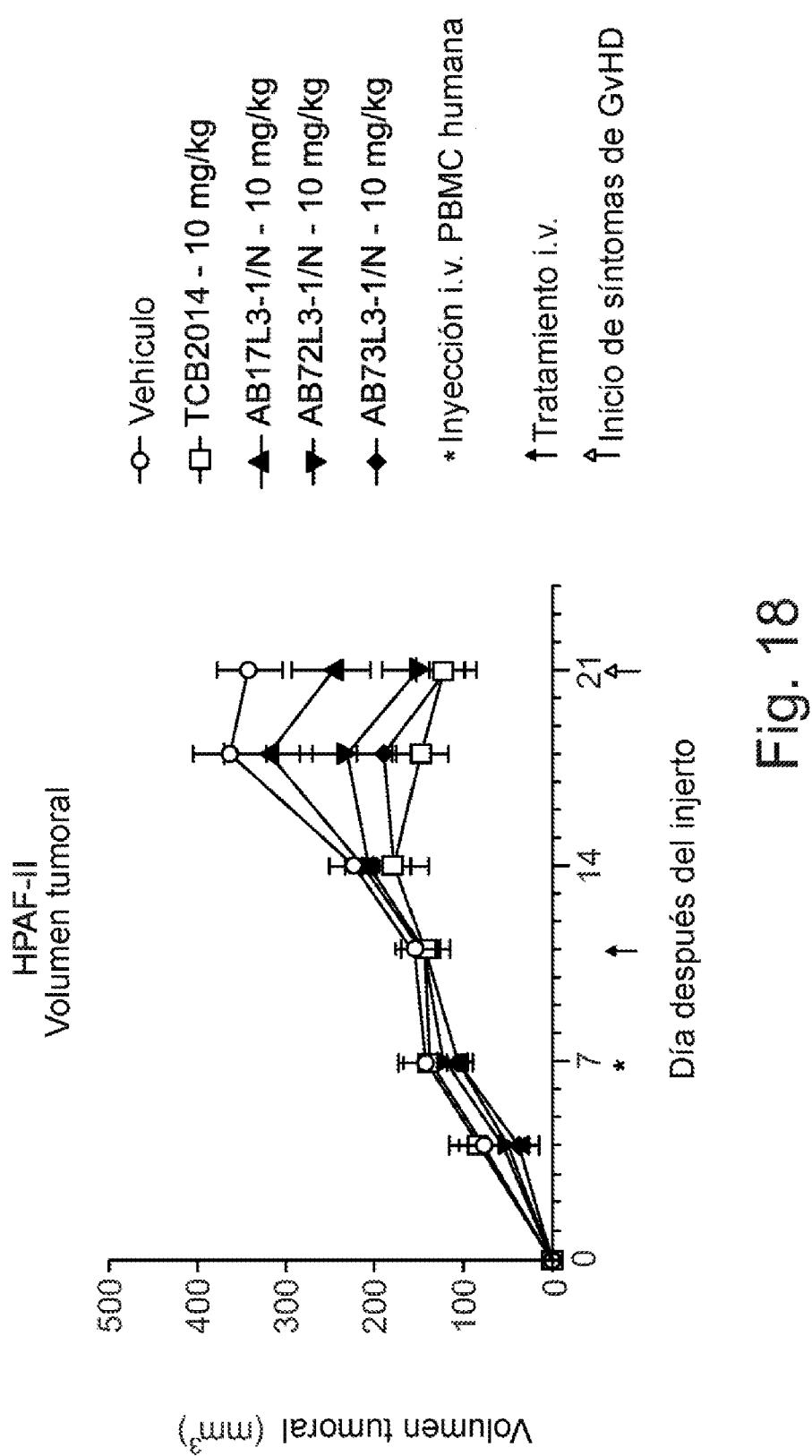


Fig. 18