

**ANTICUERPOS HUMANIZADOS CONTRA LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR
RELACIONADA AL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNICO 1 (CEACAM1)**

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere principalmente a anticuerpos humanizados, capaces de unión específica a moléculas CEACAM humanas. Más específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos contra CEACAM1, que comprenden CDRs derivadas de murino y regiones pesada y ligera humanizadas con mutaciones restauradoras específicas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La molécula de adhesión celular relacionada al antígeno carcinoembrionario 1 (CEACAM1), también conocida como agrupación de diferenciación 66a (CD66a), es un miembro de la familia de genes del antígeno carcinoembrionario (CEA) y pertenece a la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig). La CEACAM1 es sobre regulada en los linfocitos T y células NK con la activación y sus interacciones homofílicas conducen a la inhibición del efecto citotóxico de los linfocitos. Los estudios sobre muchos tipos de tumores humanos han sugerido que la explotación de la trayectoria de CEACAM1 puede permitir la evasión inmune por los tumores. Los modelos animales preclínicos de tumores han demostrado que el bloqueo de las interacciones de la CEACAM1 por los anticuerpos monoclonales (mAbs) puede mejorar la respuesta inmune a los tumores. Un estimado de 1,660,290 nuevos casos de cáncer y 580,350 muertes relacionadas con el cáncer se observaron en los Estados Unidos en 2013.

El bloqueo por Inmunoterapia de Punto de revisión ha demostrado ser una nueva opción emocionante para el tratamiento de cáncer. Las trayectorias del punto de revisión inmune consisten en una variedad de moléculas coestimulantes e inhibidoras que trabajan en armonía para mantener la auto-tolerancia y proteger a los tejidos de daño por el sistema inmune bajo condiciones fisiológicas. Los tumores se aprovechan de ciertas trayectorias de punto de revisión para evadir el sistema inmune. Por lo tanto, la inhibición de esas trayectorias ha surgido como una estrategia prometedora de tratamiento anticáncer (Pardoll, D. M., 2012, Nat Rev Cancer, 12, 252-264). La inmunoterapia antitumor a través del bloqueo de CEACAM1 no se limita en principio a ningún tipo de tumor, pero puede tener actividad en aumentar la respuesta inmune terapéutica a varios tumores histológicamente distintos.

El anticuerpo linfocito T 4 anti-citotóxico (CTLA-4) ipilimumab (aprobado en 2011) fue el primer agente inmunoterapéutico que mostró un beneficio para el tratamiento de pacientes de

cáncer (Robert et al., 2011, N. Engl. J. Med., Vol. 364, páginas 2517-2526). El anticuerpo interfiere con las señales inhibitoras durante la presentación del antígeno a los linfocitos T. El anticuerpo antimuerte celular programada 1 (PD-1) pembrolizumab (aprobado en 2014) bloquea la señalización negativa reguladora inmune del receptor de PD-1 expresado por los linfocitos T (Hamid, 2013, N. Engl. J. Med., Vol. 2, páginas 134-144). Los anticuerpos de bloqueo del eje PD-1/PL-L1 axis han demostrado resultados prometedores en muchos ensayos clínicos en pacientes con varios tipos de tumores (Dolan y Gupta 2014, Cancer Control, Vol. 21, páginas 231-237). Un agente adicional anti-PD-1 se ha presentado para aprobación reguladora en 2014 para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La investigación activa actualmente está explorando muchos otros puntos de revisión inmune, entre ellos: el gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), CD137, OX40 (también denominado CD134), y los receptores del tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR) (Gelao et al., 2014, Toxins, Vol. 6, páginas 914-933).

Los anticuerpos humanizados son anticuerpos de especies no humanas (por ejemplo, anticuerpos de murino) cuyas secuencias proteicas se han modificado para aumentar su similitud a las variantes del anticuerpo producidas naturalmente en humanos. El procedimiento de "humanización" normalmente se aplica a anticuerpos monoclonales desarrollados para la administración a humanos, y se realiza cuando el procedimiento de desarrollo de un anticuerpo específico implica la generación en un sistema inmune no humano (tal como en ratones). Las secuencias proteicas de los anticuerpos producidos de este modo son distintas de los anticuerpos naturales en humanos, y por lo tanto son inmunogénicas cuando se administran a pacientes humanos. Los anticuerpos humanizados se consideran distintos de los anticuerpos quiméricos, que tienen secuencias proteicas similares a los anticuerpos humanos, pero portan largas porciones de proteína no humana.

Es posible producir un anticuerpo humanizado sin crear un intermediario quimérico. La creación directa de un anticuerpo humanizado puede efectuarse al insertar los segmentos codificadores de CDR apropiados (responsables de las propiedades de unión deseadas) en un andamio de anticuerpo humano, un procedimiento conocido como "injerto de CDR". En general, después de que se ha desarrollado un anticuerpo con las propiedades deseadas en un ratón (u otro animal no humano), puede secuenciarse la codificación del ADN para esos CDR del anticuerpo. Una vez conocidas las secuencias exactas de los CDR deseados, estas secuencias se insertan en un constructo que contiene ADN para un marco de anticuerpo humano.

La WO 2010/125571 de los presentes inventores revela un anticuerpo monoclonal de murino (MRG-1) producido por célula de hibridoma específico. El mAb es altamente selectivo para CEACAM1 y no reacciona de modo cruzado con otros miembros de la familia de CEACAM. La WO 2013/054331 de los presentes inventores revela un anticuerpo quimérico (CM-10), también

altamente selectivo a CEACAM1.

Aunque hay un progreso en el campo de la inmunoterapia, permanece una constante necesidad de nuevos tratamientos que sean más efectivos y más duraderos y que involucren objetivos novedosos y que puedan trabajar ya sea como agentes de señal o en combinación con terapias conocidas para eventualmente generar respuestas muy durables en pacientes de cáncer. Existe una necesidad insatisfecha de proporcionar anticuerpos humanizados que reconozcan las proteínas específicas de CEACAM que sean más seguras y más potentes y que puedan usarse diagnóstica y terapéuticamente en enfermedades que involucren a la expresión o activación de las proteínas de CEACAM.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos humanizados que reconocen la CEACAM1. Los anticuerpos humanizados seleccionados según la presente invención contienen muchas "mutaciones restauradoras" específicas en sus secuencias de región variable, a saber, mutaciones de la secuencia humanizada de vuelta a la secuencia de ratón. Estas mutaciones restauradoras se forman en residuos críticos para el mantenimiento de la conformación y afinidad de unión original de los anticuerpos, mientras que tiene la incidencia más baja de epítomos de linfocitos T potenciales, minimizando así el riesgo de una respuesta inmune adversa hacia los anticuerpos.

Para produce un mAb humanizado que reconoce CEACAM1 con secuencias específicas de CDR en la orientación y conformación deseados y marco humano, los inventores de la presente invención identificaron los residuos clave en el marco humano (fuera de las secuencias de CDR) que afectan la presentación de la CDR y diseñaron un arreglo de mutaciones en estos residuos clave para restaurar la presentación correcta de las CDRs, mientras se minimiza la inmunogenicidad de los anticuerpos. La presente invención entonces proporciona, por primera vez, un anticuerpo humanizado contra CEACAM1 de alta afinidad, no inmunogénico, altamente específico.

La presente invención proporciona, según un aspecto, un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) que específicamente reconoce la CEACAM1 humana, o un fragmento del mismo que comprende al menos el dominio de unión antigénico, que comprende al menos una región variable seleccionada del grupo que consiste en: (i) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente; y (ii) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente; en donde al menos una de (i) y (ii) contiene 1-25 mutaciones restauradoras de residuos de aminoácidos de una

secuencia humana a una de murino.

Según algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) o un fragmento del mismo, que específicamente reconoce la CEACAM1 humana, que comprende al menos una región variable seleccionada del grupo que consiste en (i) una
 5 secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR establecidas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada difiere de SEQ ID NO: 57 en 1-25 residuos de aminoácidos en las secuencias de marco; y (ii) una secuencia de aminoácidos de región variable de
 10 cadena ligera que comprende las secuencias de CDR establecidas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, en donde la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera difiere de SEQ ID NO: 58 en 1-10 residuos de aminoácidos en las secuencias de marco.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) o un fragmento del mismo, que específicamente reconoce la CEACAM1 humana, que comprende: (i) las secuencias de CDR establecidas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:
 15 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6; (ii) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que difiere en 3-13 residuos de aminoácidos de marco de SEQ ID NO: 57; y (iii) secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que difiere en 3-5 residuos de aminoácidos de marco de SEQ ID NO: 58.

Según ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos de región variable de
 20 cadena pesada difiere de SEQ ID NO: 57 en 3-13 residuos de aminoácidos en las secuencias de marco. Según otras modalidades, la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera difiere de SEQ ID NO: 58 en 3-5 residuos de aminoácidos en las secuencias de marco.

Según otras modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal no completamente humanizado, que comprende (i) una región variable de cadena
 25 pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente, y una secuencia de aminoácidos de marco que difiere en 2 a 9 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 9; y/o (ii) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ
 30 ID NO: 6, respectivamente, y una secuencia de aminoácidos de marco que difiere en 2 a 4 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 13; y análogos, derivados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que específicamente reconocen la CEACAM1.

Según algunas modalidades, la secuencia de mAb comprende 1-50 mutaciones restauradoras a una secuencia de murino. Según otras modalidades, la secuencia de mAb
 35 comprende 2-30 mutaciones restauradoras a una secuencia de murino. Según incluso otras

modalidades, la secuencia de mAb comprende 3-20 mutaciones restauradoras a una secuencia de murino. Según otras modalidades, la secuencia de mAb comprende 4-15 mutaciones restauradoras a una secuencia de murino. Según otras modalidades, la cadena pesada de la secuencia de mAb comprende 1-15 mutaciones restauradoras a una secuencia de murino. Según otras modalidades, la

5 cadena ligera de la secuencia de mAb comprende 1-15 mutaciones restauradoras a una secuencia de murino. Según otras modalidades, la cadena pesada de la secuencia de mAb comprende 2-9 mutaciones restauradoras a una secuencia de murino y la cadena ligera de la secuencia de mAb comprende 2-4 mutaciones restauradoras a una secuencia de murino.

Según algunas modalidades específicas, el mAb humanizado comprende 1-25

10 mutaciones en la secuencia de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 57 de secuencia de humano a murino. Según algunas modalidades, la cadena pesada del mAb humanizado comprende al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: V11, R38, M48, V68, M70, R72, T74, S77, R85, R87, T91, Y95 y T115 de SEQ ID NO: 57. Según algunas modalidades, al menos una mutación restauradora en SEQ ID NO: 57 se selecciona del grupo que consiste en: V11L,

15 R38K, M48I, V68A, M70L, R72A, T74K, S77N, R85S, R87T, T91S, Y95F y T115S.

Según otras algunas modalidades específicas, el mAb humanizado comprende 1-25 mutaciones en la secuencia de cadena ligera establecida en SEQ ID NO: 58 de secuencia de humano a murino. Según algunas modalidades, la cadena ligera de mAb humanizado comprende al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: P44, F71, F73, P80 y Y87 de

20 SEQ ID NO: 58. Según algunas modalidades, la al menos una mutación restauradora en SEQ ID NO: 58 se selecciona del grupo que consiste en: P44V, F71Y, F73L, P80Q, y Y87F.

Según algunas modalidades, la cadena pesada del mAb humanizado comprende al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: V11, R38, M48, V68, M70, R72, T74, S77, R85, R87, T91, Y95 y T115 de SEQ ID NO: 57, y la cadena ligera del mAb

25 humanizado comprende al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: P44, F71, F73, P80 y Y87 de SEQ ID NO: 58. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

Según algunas modalidades, la cadena pesada del mAb humanizado comprende al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: V68, M70, R72, T74,

30 S77, R85, R87, T91, y Y95 de SEQ ID NO: 57, y la cadena ligera del mAb humanizado comprende al menos una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: F71, F73, P80 y Y87 de SEQ ID NO: 58. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

Según algunas modalidades, al menos una mutación restauradora en SEQ ID NO: 57 se selecciona del grupo que consiste en: V11L, R38K, M48I, V68A, M70L, R72A, T74K, S77N, R85S,

35 R87T, T91S, Y95F y T115S, y la al menos una mutación restauradora en SEQ ID NO: 58 se

selecciona del grupo que consiste en: P44V, F71Y, F73L, P80Q, y Y87F. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

Según algunas modalidades, al menos una mutación restauradora en SEQ ID NO: 57 se selecciona del grupo que consiste en: V68A, M70L, R72A, T74K, S77N, R85S, R87T, T91S, y Y95F, y la al menos una mutación restauradora en SEQ ID NO: 58 se selecciona del grupo que consiste en: F71Y, F73L, P80Q, y Y87F. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende al menos una secuencia de marco de cadena pesada establecida en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 23. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de marco de cadena pesada establecida en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende secuencias de marco de cadena pesada establecidas en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22; y SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 23. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de región variable de cadena pesada establecida en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 32.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de marco de cadena ligera establecida en una secuencia seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de marco de cadena ligera establecida en una secuencia seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende secuencias de marco de cadena ligera establecidas en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27; y SEQ ID NO: 14. Cada

posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal comprende las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 34.

En ciertas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende: (i) las secuencias de marco de cadena pesada establecidas en: SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22; y SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 23, y (ii) las secuencias de marco de cadena ligera establecidas en: SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27; y SEQ ID NO: 14. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 35. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 32, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 34.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 28, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 33. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 29, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 33. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 30, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 33. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 31, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 33. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 32, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 33.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 28, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 34. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 29, y las

secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 34. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 30, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 34. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de
 5 región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 31, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 34.

En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 28, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 35. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal
 10 comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 29, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 35. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 30, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 35. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de
 15 región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 31, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 35. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 32, y las secuencias de región variable de cadena ligera establecidas en SEQ ID NO: 35.

Según algunas modalidades, la cadena pesada del mAb humanizado se selecciona del isotipo IgG4 e IgG1. Según algunas modalidades, la cadena pesada del mAb humanizado es del isotipo IgG4. Según algunas modalidades, la cadena ligera del mAb humanizado es del isotipo kappa. Según algunas modalidades específicas, el mAb humanizado comprende un isotipo kappa de cadena ligera y un isotipo IgG4 de cadena pesada. Según otras modalidades específicas, el mAb humanizado comprende un isotipo kappa de cadena ligera y un isotipo IgG1 de cadena pesada.

Según algunas modalidades, el mAb comprende una cadena ligera establecida en SEQ ID NO: 52. Según algunas modalidades, el mAb comprende una cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 59. Según algunas modalidades, el mAb comprende una cadena ligera establecida en SEQ ID NO: 52 y una cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 53. Según algunas modalidades, el mAb comprende una cadena ligera establecida en SEQ ID NO: 52 y una cadena
 30 pesada establecida en SEQ ID NO: 59.

Según algunas modalidades, el mAb comprende una región variable de cadena ligera establecida en SEQ ID NO: 58 y una cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 53. Según algunas modalidades, el mAb comprende una región variable de cadena ligera establecida en SEQ ID NO: 58 y una cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 59. Según algunas modalidades, el mAb comprende
 35 una cadena ligera establecida en SEQ ID NO: 52 y una región variable de cadena pesada establecida

en SEQ ID NO: 57.

La presente invención también proporciona un mAb que comprende una región variable de cadena ligera establecida en SEQ ID NO: 58 y una región variable de cadena pesada establecida en SEQ ID NO: 57.

5 En algunas modalidades, el mAb humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de unirse con una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-8} M a una proteína humana de CEACAM1. En algunas modalidades, el mAb humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de unirse con una afinidad de al menos aproximadamente 5×10^{-7} M a al menos una de una proteína de CEACAM3 humana y CEACAM5 humana.

10 La presente invención proporciona además, en otro aspecto, análogos y/o derivados del anticuerpo monoclonal descrito antes, con al menos 90% de identidad de secuencia con el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo monoclonal.

Los fragmentos de mAbs que reconocen a CEACAM1, que comprenden al menos un dominio de unión a antígeno, también están incluidos dentro del alcance de la presente invención en tanto que comprendan las secuencias de CDR antes definidas y al menos una mutación restauradora de una secuencia humana a una secuencia de murino.

15 La presente invención proporciona además, en otro aspecto, polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo monoclonal descrito antes o un fragmento del mismo, que específicamente reconoce a la CEACAM1 humana.

20 En algunas modalidades, la secuencia aislada de polinucleótidos comprende las secuencias de ADN establecidas en cualquiera de SEQ ID NOs: 44 a 51 que codifican una región variable de mAb humanizado, o análogos de los mismos con al menos 90% de identidad de secuencia con dichas secuencias. En algunas modalidades, la secuencia aislada de polinucleótidos comprende las secuencias de ADN establecidas en SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 55 que codifican una cadena pesada de mAb humanizado, o análogos de los mismos con al menos 90% de identidad de secuencia con dichas secuencias. En algunas modalidades, la secuencia aislada de polinucleótidos comprende las secuencias de ADN establecidas en SEQ ID NO: 56 que codifican una cadena ligera de mAb humanizado, o análogos de los mismos con al menos 90% de identidad de secuencia con dichas secuencias.

30 La presente invención proporciona además, en otro aspecto, a plásmido que comprende el polinucleótido aislado descrito antes.

La presente invención proporciona además, en otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo monoclonal descrito antes, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende 1-50 mg/ml de

mAb humanizado para CEACAM1. Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un aminoácido básico. Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un azúcar. Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un agente tensoactivo. Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un aminoácido básico, un azúcar y un agente tensoactivo. Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende (i) 1-10 mg/ml de aminoácido básico; (ii) 10/100 mg/ml de un azúcar; (iii) 0.01-1 mg/ml de un agente tensoactivo; (iv) 1-50 mg/ml de mAb humanizado para CEACAM1, 4-6 mg/ml de aminoácido básico, 70-100 mg/ml de un azúcar y 0.1-1 mg/ml de agente tensoactivo no iónico; o (v) 10 mg/ml de mAb humanizado para CEACAM1, 4.65 mg/ml de L-Histidina, 82 mg/ml de sacarosa y 0.20 mg/ml de polisorbato 20.

Según algunas modalidades, el aminoácido básico se selecciona del grupo que consiste en: Histidina, Arginina, Lisina y Ornitina. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. Según algunas modalidades, la composición comprende 1-10, 2-9, 3-7 o 4-6 mg/ml de aminoácido básico. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

Según algunas modalidades, el azúcar se selecciona del grupo que consiste en: sacarosa, trehalosa, glucosa, dextrosa y maltosa. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. Según algunas modalidades, la composición comprende 10-200, 10-100, 50-150 o 70-100 mg/ml de azúcar. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

Según incluso otras modalidades, la composición comprende poliol, incluyendo pero sin limitación a manitol y sorbitol. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

Según algunas modalidades, el agente tensoactivo es no iónico. Según algunas modalidades, el agente tensoactivo es seleccionado del grupo que consiste en: polisorbatos, ésteres de sorbitán y poloxámeros. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. Según algunas modalidades, el agente tensoactivo es seleccionado del grupo que consiste en: polisorbato 20, polisorbato 80. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. Según algunas modalidades, la composición comprende 0.01-10, 0.01-1, 0.05-5 o 0.1-1 mg/ml de agente tensoactivo. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende 4-6 mg/ml de aminoácido básico, 70-100 mg/ml de un azúcar y a 0.1-1 mg/ml de agente tensoactivo.

Según algunas modalidades, la composición farmacéutica está en forma líquida y comprende 1-50 mg/ml de mAb humanizado para CEACAM1 que comprende al menos una mutación restauradora a una secuencia de murino. Según otras modalidades, la composición farmacéutica es

líoilizada. Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende: 10 mg/ml de mAb humanizado para CEACAM1, 4.65 mg/ml de L-Histidina, 82 mg/ml de sacarosa y 0.20 mg/ml de polisorbato 20.

5 Según algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende al menos un mAb humanizado o fragmento definido antes y un inmunomodulador adicional o un inhibidor de cinasa. Según algunas modalidades, una composición farmacéutica que comprende al menos un mAb humanizado o fragmento definido antes, y una composición farmacéutica que comprende un inmunomodulador adicional o un inhibidor de cinasa, se usa en el tratamiento de cáncer por administración separada.

10 Según algunas modalidades específicas, el inmunomodulador adicional se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), PD-L1 y PD-L2, una célula de linfocito citotóxico activado, un agente activador de linfocito, y un inhibidor de la trayectoria de RAF/MEK. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. Según algunas modalidades específicas, el inmunomodulador adicional se selecciona del
15 grupo que consiste en: mAb para PD-1, mAb para PD-L1, mAb para PD-L2, Interleucina 2 (IL-2), célula asesina activada por linfocina (LAK).

Según algunas modalidades, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un mAb humanizado que contiene mutaciones restauradoras, como se definió antes o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y una composición farmacéutica que comprende un
20 mAb para al menos uno de proteína de muerte celular programada humana 1 (PD-1), PD-L1 y PD-L2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para uso en el tratamiento de cáncer por la administración por separado.

Según otras modalidades se proporciona una composición farmacéutica que comprende un mAb humanizado para CEACAM definido antes o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y una célula activada de linfocito activado. En ciertas modalidades, la célula activada de linfocito activado se selecciona del grupo que consiste en una célula LAK, una célula CIK, y cualquier combinación de los mismos. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la invención. En ciertas modalidades, la célula activada de linfocito activado es una célula asesina activada por linfocina (LAK).

30 En otras modalidades, la composición farmacéutica comprende un mAb humanizado para CEACAM1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un agente activador de linfocito o un fragmento, análogo o proteína de fusión del mismo. En ciertas modalidades, el agente activador de linfocito se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IFN γ , un anticuerpo anti-CD3 y fragmentos, análogos o proteínas de fusión de los mismos. En ciertas modalidades, el agente activador de
35 linfocito es IL-2 o un fragmento, análogo o proteína de fusión del mismo. Cada posibilidad

representa una modalidad separada de la invención.

En incluso otras modalidades, la composición farmacéutica comprende un inhibidor de una cinasa seleccionado del grupo que consiste en un mutante de cinasa B-Raf, una cinasa MEK1 y una cinasa MEK2, y un mAb humanizado para CEACAM1 humana definido antes o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Según algunas modalidades específicas, el inhibidor de cinasa B-Raf atenúa o previene la fosforilación de MEK1 o MEK2 por la cinasa mutante de B-Raf. En ciertas modalidades, el inhibidor de cinasa B-Raf atenúa o previene la dimerización de la cinasa mutante de B-Raf. En ciertas modalidades, el inhibidor de cinasa MEK1 atenúa o previene la fosforilación de MAPK por la cinasa MEK1. En ciertas modalidades, el inhibidor de cinasa MEK2 atenúa o previene la fosforilación de MAPK por la cinasa MEK2.

La presente invención proporciona además, según otras modalidades, un inhibidor de una cinasa seleccionada del grupo que consiste en una cinasa mutante de B-Raf, una cinasa MEK1 y una cinasa MEK2, y un mAb humanizado para CEACAM1 humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para uso para tratar cáncer. Los dos principios activos pueden ser parte de una composición farmacéutica o de separadas que pueden administrarse simultáneamente o por administraciones por separado.

El mAb humanizado para CEACAM1 según la presente invención y el inmunomodulador adicional pueden estar contenidos en una composición farmacéutica o en composiciones separadas para la administración simultánea o por separado.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica es para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, activación o función de un miembro de la familia de proteínas de CEACAM, incluyendo pero sin limitación a CEACAM1. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica es para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, activación o función de CEACAM1. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno proliferativo de células. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno proliferativo de células es un cáncer.

Según algunas modalidades el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: melanoma, cáncer colorrectal, de vejiga, de pulmón, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLA), gastrointestinal, pancreático, de mama, de próstata, de tiroides, de estómago, de ovario, mieloma y uterino. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

La presente invención proporciona además, en otro aspecto, una composición de

diagnóstico que comprende al menos un mAb humanizado o un fragmento del mismo, que específicamente reconoce la CEACAM1 humana, como se describió antes.

La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método de prevención, atenuación o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, activación o función de una proteína de CEACAM1, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica descrita antes.

En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es un cáncer. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una infección, por ejemplo una infección viral.

En algunas modalidades, el anticuerpo aislado contenido en la composición farmacéutica se une a una porción citotóxica.

En ciertas modalidades, el método descrito antes comprende administrar al sujeto al menos una dosis de un mAb humanizado para CEACAM1 que varía de 0.01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. En ciertas modalidades, el método descrito antes comprende administrar (i) dosis de mAb humanizado múltiples, idénticas o diferentes; (ii) dosis múltiples escaladas; o (iii) la composición farmacéutica una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, o una vez cada 5 semanas. En ciertas modalidades, el método descrito antes comprende 1-10 ciclos de administración, cada ciclo comprende 2-5 infusiones cada 1-4 semanas, con un mAb humanizado, seguido por 2-8 semanas entre cada ciclo.

En ciertas modalidades, el método descrito antes comprende además administrar una célula linfocítica o una pluralidad de células linfocíticas. En algunas modalidades, el método descrito antes comprende además administrar al sujeto linfocitos que expresan CEACAM1. En algunas modalidades, los linfocitos comprenden linfocitos T, células NK o Linfocitos de Infiltración a Tumor (TILs). Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En algunas modalidades, la célula de linfocitos expresa CEACAM1, PD-1, o ambas. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En ciertas de dichas modalidades, la célula de linfocitos expresa CEACAM1 y PD-1. En algunas modalidades, la célula linfocítica se selecciona del grupo que consiste en una célula de linfocito de infiltración a tumor (TIL), una célula asesina activada por linfocina (LAK), una célula asesina inducido por citocina (CIK), un linfocito T, un linfocito B, una célula NK, y cualquier combinación de los mismos. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En ciertas de esas modalidades, la célula linfocítica se selecciona del grupo que consiste en una célula linfocítica de Infiltración a tumor (TIL) y una célula asesina activada por linfocina (LAK). En ciertas de esas modalidades, la célula linfocítica es una célula linfocítica de Infiltración a tumor (TIL) o una pluralidad de células TIL. En ciertas de dichas modalidades, la célula de linfocito es una célula asesina activada por linfocinas (LAK) o una

pluralidad de células LAK. En ciertas modalidades, la célula linfocítica está activada. En algunas modalidades, la célula de linfocitos es citotóxica para una célula de cáncer. En algunas modalidades, la célula de cáncer expresa CEACAM1, PD-L1, PD-L2, o cualquier combinación de los mismos. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En algunas modalidades, la

5 célula de cáncer expresas CEACAM1, PD-L1, o ambos. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En algunas modalidades, la célula cancerosa expresa CEACAM1, PD-L2, o ambos. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En ciertas de esas modalidades, la célula de cáncer expresa CEACAM1 y PD-L1 y PD-L2.

En ciertas modalidades, el método descrito antes comprende además administrar al

10 sujeto un agente activador de linfocito. Según algunas modalidades, el agente activador de linfocito se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IFN γ , y un anticuerpo anti-CD3. En ciertas modalidades, los métodos descritos antes comprenden además administrar al sujeto una composición anticáncer adicional.

La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método de

15 inmunomodulación, el método comprende poner en contacto un linfocito que expresa CEACAM1 con los anticuerpos o fragmentos de los mismos descritos antes.

La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método para inhibir la migración de una célula de tumor que expresa CEACAM1, el método comprende poner en contacto dicha célula de tumor que expresa CEACAM1 con los anticuerpos o fragmentos de los mismos

20 descritos antes, inhibiendo así la migración de dicha célula de tumor que expresa CEACAM.

La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método para inhibir la interacción proteína proteína homotípica o heterotípica de CEACAM1, el método comprende poner en contacto un linfocito que expresa CEACAM1 con los anticuerpos o fragmentos de los mismos descritos antes, inhibiendo así la interacción proteína proteína homotípica o heterotípica de

25 CEACAM1.

La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método para aumentar la duración o progresión de la respuesta o supervivencia de un sujeto con cáncer, que comprende administrar al sujeto cantidades efectivas de una composición que comprende un anticuerpo monoclonal como se describió antes, y una composición antineoplásica, en donde dicha

30 composición antineoplásica comprende al menos un agente quimioterapéutico, con lo cual la co-administración del anticuerpo y la composición antineoplásica aumentan de modo efectivo la duración o progresión de la supervivencia.

El método de la presente invención puede comprender administrar una composición farmacéutica definida antes junto con una composición anticáncer adicional. Según una modalidad

35 específica la composición anticáncer comprende al menos un agente quimioterapéutico. Según otras

modalidades específicas, la composición anticáncer comprende un agente inmunomodulador. El agente anticáncer, que podría ser administrado junto con el anticuerpo según la presente invención, o por separado, puede comprender cualquiera de esos agentes conocidos en la técnica que exhiben actividad anticáncer.

5 Según algunas modalidades, se proporciona un método para tratar cáncer que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado que reconoce CEACAM1 y comprende mutaciones restauradoras a una secuencia de murino, y una composición farmacéutica que comprende un inmunomodulador adicional o un inhibidor de cinasa.

10 Según algunas modalidades, el inmunomodulador se selecciona del grupo que consiste en: mAb para PD-1, mAb para PD-L1, mAb para PD-L2, Interleucina 2 (IL-2), una célula asesina activada por linfocina (LAK) y el inhibidor de cinasa es un inhibidor de B-Raf/MEK.

En algunas modalidades el método comprende la administración de dos o más composiciones farmacéuticas. En algunas modalidades, la administración de dos o más de las composiciones farmacéuticas se hace simultáneamente. En algunas modalidades del método, la administración de dos o más de las composiciones farmacéuticas se lleva a cabo de forma secuencial. En algunas modalidades del método, el inmunomodulador adicional se administra antes del mAb humanizado para la CEACAM1 humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas modalidades del método, el inmunomodulador se administra simultáneamente con el mAb para CEACAM1 humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas modalidades del método, el inmunomodulador se administra después del mAb humanizado para CEACAM1 humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas modalidades, el método comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal para PD-1 humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

Según incluso otras modalidades, los métodos descritos antes para tratar a un paciente con cáncer, comprenden el paso de administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de una cinasa seleccionada del grupo que consiste en cinasa mutante de B-Raf, una cinasa MEK1 y una cinasa MEK2, y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde las células de cáncer expresan una cinasa mutante de B-Raf, tratando de este modo al cáncer.

35 En algunas modalidades, los métodos descritos antes para tratar cáncer comprenden

además el paso de administrar a dicho paciente una composición farmacéutica que comprende una célula linfocítica. En algunas modalidades, la administración de la composición farmacéutica que comprende una célula linfocítica se hace simultáneamente con al menos una de las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos. En algunas modalidades del método, la administración
5 de dos o más composiciones farmacéuticas se hace secuencialmente.

En algunas modalidades, la célula linfocítica se preincuba con un mAb humanizado para CEACAM1 humana, con un fragmento de unión a antígeno del mismo o con el inmunomodulador adicional. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

10 Una composición farmacéutica según la presente invención puede ser administrada por cualquier medio adecuado, tal como intranasalmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, intraarterialmente, intraarticularmente, intralesionalmente oralmente, o tópicamente. Según algunas modalidades, la composición farmacéutica es administrada parenteralmente. Según algunas modalidades específicas, se utiliza la administración intravenosa
15 (i.v.).

Un método según la presente invención, para tratar cáncer u otra enfermedad o trastorno asociado a CEACAM1, comprende según algunas modalidades, administrar a un sujeto en necesidad del mismo al menos una dosis de un mAb humanizado para CEACAM1 que varía de 0.01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

20 Según algunas modalidades, la al menos una dosis se selecciona del grupo que consiste en: 0.01-0.1 mg/kg; 0.1-1 mg/kg; 1-10 mg/kg; y 10-50 mg/kg.

Según algunas modalidades, el método comprende administrar múltiples dosis de mAb humanizado, en donde las múltiples dosis son idénticas o diferentes. Según algunas modalidades, el método comprende administrar múltiples dosis escaladas. Según algunas
25 modalidades, el método comprende al menos un ciclo de administración por al menos 12 semanas.

Según otras modalidades la duración del tratamiento es 12-50 semanas. Según algunas modalidades específicas la duración del tratamiento se selecciona del grupo que consiste en: 12-20 semanas, 20-30 semanas y 30-50 semanas. Según incluso otras modalidades, el régimen de tratamiento comprende varios ciclos de administración cada uno por al menos 12 semanas.

30 Según algunas modalidades, el régimen de tratamiento comprende 1-8 ciclos, cada ciclo comprende 4 infusiones del mAb humanizado antiCEACAM por una duración de al menos 4 semanas. Según algunas modalidades el régimen de tratamiento comprende 2-6 ciclos.

Según algunas modalidades, la administración es una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, o una vez cada 5 semanas.
35 Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención.

Según algunas modalidades, un régimen de tratamiento comprende 1-10 ciclos, cada ciclo comprende 2-5 infusiones cada 1-4 semanas, con un mAb humanizado según la invención, seguido por 2-8 semanas entre cada ciclo.

5 Según algunas modalidades se proporciona un régimen de escalación de dosis que comprende la administración iniciando con 0.01 mg/kg, y continuando a 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, y 10 mg/kg. Según incluso otras modalidades, el régimen de tratamiento comprende 6 ciclos de 4 infusiones cada uno administrado cada 2 semanas.

10 La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método para diagnosticar un cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, el método comprende poner en contacto una muestra biológica derivada u obtenida de dicho sujeto con la composición de diagnóstico descrito antes, en donde la formación de un complejo más allá de un umbral predeterminado indica cáncer en dicho sujeto.

15 La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método para determinar la expresión de CEACAM1, el método comprende poner en contacto una muestra biológica con los anticuerpos o fragmentos del mismo descritos antes, y medir el nivel de formación de complejo inmune. Según algunas modalidades, el método comprende comparar dicho nivel de complejo inmune a una curva estándar obtenida de cantidades conocidas de CEACAM1.

20 La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado con una expresión de proteína CEACAM, que comprende el pasos de incubar una muestra biológica con un anticuerpo monoclonal como se describió antes; detectar la proteína CEACAM de unión usando una sonda detectable; comparar la cantidad de proteína CEACAM unida a una curva estándar obtenida de muestras de referencia que contienen cantidades conocidas de proteína CEACAM; calcular la cantidad de la proteína CEACAM en la muestra biológica de la curva estándar; y comparar la cantidad de proteína CEACAM con una
25 cantidad de proteína CEACAM normal.

Según algunas modalidades, se usa un mAb humanizado según la invención como una biomarcador predictivo asociado con un tratamiento anti-CEACAM1, basado en los niveles de expresión de CEACAM1 en especímenes de tumor antes del tratamiento. Los niveles de expresión de CEACAM1 se determinan usando métodos conocidos en la técnica utilizando un mAb humanizado
30 según la invención.

La presente invención proporciona además, en un aspecto, el uso de un anticuerpo monoclonal como se describió antes, para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno proliferativo de células o relacionado a la angiogénesis o una infección.

35 La presente invención proporciona además, en un aspecto, el uso de un anticuerpo monoclonal como se describió antes, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de

un trastorno o enfermedad asociado con la expresión o activación de una proteína CEACAM.

La presente invención proporciona además, en un aspecto, el uso de un anticuerpo monoclonal como se describió antes, para la preparación de una composición de diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno proliferativo de células o relacionado a la angiogénesis o una infección.

La presente invención proporciona además, en un aspecto, un anticuerpo monoclonal parcialmente humanizado, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de marco establecida en SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22, o región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de marco establecida en SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.

Las modalidades adicionales y el alcance completo de aplicación de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada dada posteriormente. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican modalidades preferidas de la invención, se proporcionan solamente a modo de ejemplo, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención se volverán más evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un modelo estructural de las regiones V del anticuerpo quimérico antiCEACAM-1 (CM-10) en vista superior (A) y vistas laterales en estéreo (B), producidas por el programa de modelación de homología de estructura de proteína Swiss PDB.

La Figura 2 muestra un SDS-PAGE en gel teñido con azul de Coomassie de los anticuerpos purificados de la Proteína A. Se cargaron aproximadamente 2µg de cada muestra en un gel NuPage 4-12% Bis-Tris (Invitrogen no. de cat. NP0322BOX) y se corrió a 200 V por 40 min. (A) variantes injertadas en IgG1 CDR; (B) variantes injertadas en IgG4 (S241P) CDR. Se usó Fermentas PAGERuler Plus (SM1811) como un estándar de peso molecular (conteniendo las bandas de referencia a 10, 25, y 70 kDa). Las muestras se numeraron como sigue:

30

	No.	1	2	3	4	5	6	7	8
	V _H /V _L	VH1/VK1	VH1/VK2	VH1/VK3	VH2/VK1	VH2/VK2	VH2/VK3	VH3/VK1	VH3/VK2

5	No.	9	10	11	12	13	14	15	16
	V _H /V _L	VH3/VK3	VH4/VK1	VH4/VK2	VH4/VK3	VH5/VK1	VH5/VK2	VH5/VK3	IgG quimérico

La Figura 3 es una ilustración gráfica de los resultados de los ensayos ELISA de unión de competición de CEACAM-1 humana recombinante. Se hicieron competir concentraciones variables de las variantes del anticuerpo IgG humanizado purificado contra una concentración constante de IgG biotinilado antiCEACAM-1 (IgG1 quimérico CM-10): (A) variantes de IgG1; y (B) variantes de IgG4 (S241P). Se detectó un CM-10 quimérico biotinilado, unido usando sustrato de estreptavidina HRP y TMB.

La Figura 4 representa los efectos sinérgicos de los anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en la citotoxicidad de las células de TIL humano contra células de melanoma humano. Las células de TIL se incubaron con varias concentraciones de un mAb humanizado para la CEACAM1 humana (línea negra discontinua, marcador de esfera), un mAb para PD-1 humano (línea gris sólida, marcador rectangular) o una combinación de ambos anticuerpos (línea sólida negra, marcador de triángulo). Se agregaron células de melanoma tratadas con IFN- γ para una incubación durante la noche. Los resultados representan un promedio de % de citotoxicidad $\pm$ SE como se determina por ensayo de liberación de LDH clásico de pozos por triplicado por tratamiento. *P < 0.05 prueba T emparejada en comparación con el anticuerpo monoclonal sólo a CEACAM1 humana.

Las Figuras 5A y 5B: Efectos sinérgicos de anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en los niveles de Granzima B y la citotoxicidad de células TIL humanas contra células de melanoma humano cuando se agregan anticuerpos anti-PD-1 antes de la adición de anticuerpos anti-CEACAM1. Las células de melanoma humano se cultivaron en la presencia de IFN- α para inducir la expresión de PD-L1. Las células TIL humana se incubaron con medio solamente (negro), anticuerpo IgG no específico (blanco), diversas concentraciones de un anticuerpo monoclonal a CEACAM1 humana (líneas verticales), un anticuerpo monoclonal a PD-1 humano (líneas horizontales) o una combinación de ambos anticuerpos (puntos). (A) Los resultados representan un promedio de % de citotoxicidad $\pm$ SE como se determina por el ensayo de liberación de LDH clásico de pozos por triplicado por tratamiento. * P $\leq$ 0.05 prueba T por pares en comparación de PD-1 única. (B) Los resultados representan niveles de la Granzima B $\pm$ SE como se determina mediante el kit ELISA comercial Granzima B a partir de pozos por triplicado por tratamiento.

Figura 6. Efectos sinérgicos de anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en la citotoxicidad de células LAK humanas contra células de melanoma humano cuando se agregan

anticuerpos anti-PD-1 antes de la adición de anticuerpos anti-CEACAM1. Las células de melanoma humano se cultivaron en la presencia de IFN- γ para inducir la expresión de PD-L1. Las células LAK humanas generadas por la activación de PBMCs de un donante humano sano con IL-2 se incubaron con medio solamente (blanco), anticuerpo IgG no específico (negro), diversas concentraciones de un anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humana (líneas verticales), un anticuerpo monoclonal para PD-1 humano (líneas horizontales) o una combinación de ambos anticuerpos (puntos). Los resultados representan un promedio de % de citotoxicidad $\pm$ SE como se determina por ensayo de liberación de LDH clásico de pozos por triplicado por tratamiento. *P <0.05 Prueba T emparejada en comparación con sólo un PD-L1. El índice de combinación se calculó como se describe anteriormente.

Figura 7. El tratamiento con anticuerpos anti-CEACAM1 aumenta la expresión de PD-L1 en las células objetivo de cáncer. Las células NK (NK92MI) se incubaron con o sin CM-24 (10 μ g/ml), seguido por la adición de células de melanoma humano (SKMEL28). Las células se incubaron durante 24, 48 y 72 horas y los niveles de PD-L1 se midieron en cada punto de tiempo por análisis de FACS. La relación media de anti-PD-L1 en comparación a un control de isotipo apropiado para los tratamientos indicados en diferentes puntos de tiempo.

Figura 8. Los efectos sinérgicos de anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en la progresión tumoral en ratones inmuno-competentes. Las células de linfoma murino se implantaron subcutáneamente en el abdomen de ratones BALB/C (día 1). En los días 10, 15 y 20, los ratones recibieron por vía intravenosa, ya sea PBS (línea discontinua negra, círculos vacíos), un anticuerpo CEACAM1 anti-murino (línea gris sólida, rectángulos grises), un anticuerpo PD-1 anti-murino (línea sólida gris, triángulos grises) o una combinación de ambos anticuerpos (línea de color negro sólida, esferas negras).

Figura 9. Los anticuerpos anti-CEACAM1 aumentan la citotoxicidad de células LAK humanas contra células de melanoma humano. Las células LAK humanas se incubaron con CM-24 en diferentes concentraciones por 30 minutos a 37°C. Las células de cáncer de melanoma humano (SKMEL28) se agregaron por una incubación de 24 horas. Los resultados representan un promedio de % de citotoxicidad $\pm$ SE como se determina por ensayo de liberación de LDH clásico de pozos por triplicado por tratamiento. * P $\leq$ 0.05 prueba T en pares en comparación a efectoras + células objetivo sólo con medio.

Figura 10. Los anticuerpos anti-CEACAM1 aumentan la citotoxicidad de las células LAK humanas contra las células de cáncer pancreático humano T3M4. Las células LAK humanas se incubaron con CM-24 en diferentes concentraciones por 30 minutos a 37°C. Las células de cáncer pancreático humano T3M4 se agregaron para una incubación de 24 horas. Los resultados representan un promedio de % de citotoxicidad $\pm$ SE como se determina por ensayo de liberación de

LDH clásico de pozos por triplicado por tratamiento. * $P < 0.05$ prueba T en pares en comparación a efectoras + células objetivo sólo con medio.

Figura 11. Los anticuerpos anti-CEACAM1 mejoran la secreción de IFN- γ de células LAK humanas en la presencia de células de cáncer humano. Las células LAK humanas se incubaron con CM-24 en diferentes concentraciones por 30 minutos a 37°C. Se agregaron células de cáncer de pulmón humano H358 (11A) o H460 (11B) para una incubación de 24 horas. Se midió la secreción de IFN- γ por ELISA. Los resultados representan la media + S.E de los valores de liberación de Granzima B de 3 repeticiones por tratamiento. * $P < 0.05$ prueba T en pares en comparación a efectoras + células objetivo sólo con medio.

Las Figuras 12A y 12B presentan la correlación entre la expresión de los tipos de CEACAM1 CEACAM1 largo (A) y CEACAM1 corto (B), y la resistencia a los inhibidores de mutantes de B-Raf en células de cáncer.

La Figura 13A presenta pictogramas de pulmones removidos de ratones injertados con células de melanoma y tratados según los grupos de tratamiento indicados en la Figura; la Figura 13B presenta el peso promedio del tumor de cada grupo de tratamiento; y la Figura 13C presenta el número de lesiones por ratón de cada grupo de tratamiento.

La Figura 14 es un histograma de barras que presenta el porcentaje de ocupación del receptor de CEACAM1 en células TIL aisladas del modelo de lesiones de pulmón.

Las Figuras 15A y 15B representan las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada del mAb anti-CEACAM1 humanizado con mutación restauradora, denotado CM-24, actualmente en ensayo clínico. La Figura 15A contiene la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 52) en donde los residuos de aminoácidos 1-107 son la región variable que incluye CDRs y residuos de aminoácidos 108-214 (en negritas) son la región constante de kappa de cadena ligera. La Figura 15B representa la secuencia de cadena pesada (SEQ ID NO: 53), los residuos de aminoácidos 1-120 son la región variable, los residuos de aminoácidos 121-447 (en negritas) son la región constante de cadena pesada de IgG4, y el sitio de N-glucosilación pronosticado (Asparagina 297) está subrayado. La Figura 15C representa la secuencia de cadena pesada (SEQ ID NO: 59), los residuos de aminoácidos 1-121 son la región variable, los residuos de aminoácidos 122-450 (en negritas) son la región constante de cadena pesada de IgG1, y el sitio de N-glucosilación pronosticado (Asparagina 300) está subrayado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención revela anticuerpos monoclonales no completamente humanizados que reconocen la CEACAM1. Ventajosamente, los anticuerpos de la invención son caso

completamente humanizados, evitando así el riesgo de una respuesta inmune adversa hacia el anticuerpos y por lo tanto son seguros para uso *in vivo* en humanos. Los anticuerpos de la invención se caracterizan por tener una secuencia de CDR única y un diseño y secuencias de marco no completamente humanizadas novedosas. Las propiedades únicas de los anticuerpos monoclonales de la presente invención, amplían su utilidad terapéutica para el tratamiento y diagnóstico de tipos adicionales de malignidades y varias infecciones. Más específicamente, los anticuerpos monoclonales proporcionados por la presente invención tienen combinaciones específicas de CDRs y secuencias de marco no completamente humanizadas, y poseen propiedades únicas y mejor seguridad y potencia sobre los anticuerpos anti-CEACAM1 no humanos conocidos.

Las propiedades únicas de los anticuerpos proporcionados por la presente invención confieren muchas ventajas al uso de estos anticuerpos en humanos, específicamente en aplicaciones que requieren una administración a largo plazo o repetida, cuando otros anticuerpos no humanos no pueden administrarse por miedo a producir una respuesta inmunogénica hacia los mismos anticuerpos no humanos. Evitar esa respuesta inmune se vuelve más crucial cuando la persona tratada es un paciente infectado con una enfermedad, donde debe evitarse agravar más la salud del paciente. La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un anticuerpo monoclonal no completamente humanizado, que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente, y una secuencia de aminoácidos no de CDR (marco) que difiere en 2 a 9 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 9; y/o (ii) la región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente, y una secuencia de aminoácidos no de CDR que difiere en 2 a 4 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 13; y análogos, derivados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que específicamente reconocen la CEACAM1 humana.

Por el bien de claridad, se enfatiza que las regiones variables de los anticuerpos proporcionados por la presente invención comprenden (a) las secuencias de CDR previamente descritas por los inventores de la presente invención, y (b) secuencias de marcos, también denotadas en la presente secuencias no de CDR, al menos una de las cuales es diferente en al menos un residuo de una correspondiente secuencia de marco completamente humana.

En ciertas modalidades, la frase "una secuencia que difiere de otra secuencia" como se usa en la presente significa una secuencia que contiene una substitución de al menos un aminoácido, una inserción de al menos un aminoácido, una delección de al menos un aminoácido, o cualquier combinación de los mismos, en comparación con una secuencia respectiva. En ciertas modalidades, la frase "una secuencia que difiere de otra secuencia" como se usa en la presente

significa una secuencia que contiene una substitución de al menos un aminoácido en comparación con una secuencia respectiva. El término "secuencia no de CDR" como se usa en la presente se refiere a la secuencia de marco, a saber, cualquier secuencia de aminoácidos comprendida en una región variable de un anticuerpo, que no es una secuencia de CDR secuencia identificada por la presente invención. Ejemplos de secuencia no de CDR incluyen secuencias precedentes o adyacentes a CDR1, secuencias entre CDR1 y CDR2, secuencias entre CDR2 y CDR3, y secuencias después de o adyacentes a CDR3.

Ya que las regiones variables de los anticuerpos proporcionados por la presente invención difieren en al menos un aminoácido de las regiones variables de los anticuerpos completamente humanos, también son marcados como anticuerpos "no completamente humanizados" y "no completamente humanos".

El término "CEACAM1" se usa para referirse al producto de proteína del gen CEACAM1 por ejemplo, NP_001020083.1, NP_001703.2. En los seres humanos, 11 diferentes variantes de empalme CEACAM1 se han detectado hasta ahora. Las isoformas de CEACAM1 individuales difieren con respecto al número de dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (por ejemplo, CEACAM1 con cuatro dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina se conoce como CEACAM1-4), anclaje de membrana y/o la duración de su cola citoplasmática (por ejemplo, CEACAM1-4 con una larga cola citoplasmática se conoce como CEACAM1-4L y CEACAM1-4 con una corta cola citoplasmática que se conoce como CEACAM1-4S). El dominio N-terminal de CEACAM1 inicia inmediatamente después que el péptido señal y su estructura es considerada como tipo IgV. Por ejemplo, en P13688 anotación CEACAM1, el dominio de tipo IgV N-terminal se compone de 108 aminoácidos, desde el aminoácido 35 a 142. Este dominio se identificó como el responsable de la actividad de unión homofílica (Watt et al., 2001, Blood. 98, 1469-79). Todas las variantes, incluyendo estas variantes de empalme se incluyen dentro del término "CEACAM1".

Los términos "anticuerpo anti-CEACAM1", "un anticuerpo que reconoce la CEACAM1", "un anticuerpo contra CEACAM1" y "un anticuerpo para CEACAM1" son intercambiables, y se usan en la presente para referirse a un anticuerpo que se une a la proteína CEACAM1 con suficiente afinidad y especificidad.

El término "antígeno" como se usa en la presente se refiere a una molécula o una parte de una molécula capaz de producir la formación del anticuerpo y que se une mediante un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La reacción específica antes mencionada pretende indicar que el antígeno reaccionará, en una manera altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos. Un antígeno según la presente invención es una proteína CEACAM1 o un fragmento de la misma.

El término "determinante antigénico" o "epítipo" como se usa en la presente se refiere a la región de una molécula de antígeno que específicamente reacciona con un anticuerpo particular. Pueden usarse las secuencias peptídicas derivadas de un epítipo, solas o junto con una porción portadora, aplicando métodos conocidos en la técnica, para inmunizar animales y para
 5 producir anticuerpos adicionales policlonales o monoclonales. Los péptidos aislados derivados de un epítipo pueden usarse en métodos de diagnóstico para detectar anticuerpos y como agentes terapéuticos cuando se requiere la inhibición de dichos anticuerpos.

Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, comprenden dos cadenas pesadas unidas entre sí por enlaces bisulfuro y dos cadenas ligeras, cada cadena ligera está ligada a una respectiva
 10 cadena pesada mediante enlaces de disulfuro en una configuración en forma de "Y". La digestión proteolítica de un anticuerpo produce los dominios Fv (fragmento variable) y Fc (fragmento cristalino). Los dominios de unión a antígeno, Fab, incluyen regiones en las que la secuencia del polipéptido varía. El término $F(ab')_2$ representa dos brazos Fab' unidos entre sí por enlaces bisulfuro. El eje central del anticuerpo se denomina el fragmento Fc. Cada cadena pesada tiene en un extremo
 15 un dominio variable (V_H) seguido por diversos dominios constantes (C_H). Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante (C_L) en su otro extremo, el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada y el dominio constante de cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada ($CH1$). Los dominios variables de cada par de cadenas ligera y pesada forman el sitio de unión al
 20 antígeno. Los dominios en las cadenas ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones de marco, cuyas secuencias son relativamente conservadas, unidas por tres dominios hipervariables conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR1-3). Estos dominios contribuyen a especificidad y afinidad del sitio de unión al antígeno. El isotipo de la cadena pesada (gamma, alfa, delta, epsilon o mu) determina la
 25 clase de inmunoglobulina (IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, respectivamente). La cadena ligera es uno de los dos isotipos (kappa, κ o lambda, λ) se encontró en todas las clases de anticuerpos.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos
 30 biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos suficientemente largos para exhibir la actividad biológica deseada.

El anticuerpo según la presente invención es una molécula que comprende al menos la parte de unión a antígeno de un anticuerpo. El anticuerpo o anticuerpos según la invención incluyen anticuerpos intactos, tales como anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales
 35 (mAbs), así como fragmentos proteolíticos de los mismos, tales como los fragmentos Fab o $F(ab')_2$.

Los anticuerpos de una cadena también caen dentro del alcance de la presente invención.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, generalmente incluyendo un sitio de unión de antígeno del anticuerpo intacto y retener de este modo la capacidad de unirse al antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos abarcados por la presente definición se incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el C-término del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd que tiene dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd' que tiene dominios VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el C-término del dominio CH1; (v) el fragmento Fv que tiene dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward et al., Nature 1989, 341, 544-546), que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, cadena sencilla Fv, scFv) (Bird et al., Science 1988, 242, 423-426; y Huston et al., PNAS (USA) 1988, 85, 5879-5883); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión de antígeno, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448); (xi) anticuerpos lineales que comprenden un par de segmentos Fd tándem (VH-CH1-VH CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al. Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; y Patente de E.U.A. No. 5,641,870).

Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser polipéptidos compuestos de cadena sencilla que tienen capacidades de unión de antígeno y que comprende homólogo de secuencias de aminoácido o análogo a las regiones variables de una cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, es decir V_H-V_L enlazado o Fv de cadena sencilla (scFv).

El término "anticuerpo neutralizante" como se usa en la presente se refiere a una molécula con un sitio de unión a antígeno a un receptor específico o ligando objetivo capaz de reducir o inhibir (bloquear) la actividad o señalización a través de un receptor, según se determina por ensayos *in vivo* o *in vitro*, de acuerdo con la especificación.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en general aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, siendo dirigidos contra un solo antígeno. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un

único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Abs monoclonales se pueden obtener por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención puede ser hecha por el procedimiento del hibridoma descrito primero por Kohler et al., Nature 1975,256,495, o pueden hacerse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clarkson et al., Nature 1991, 352, 624-628 o Marks et al., J. Mol. Biol, 1991, 222: 581-597, por ejemplo.

Los mAbs de la presente invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, o IgA. Puede cultivarse un hibridoma que produce un mAb *in vitro* o *in vivo*. Pueden obtenerse títulos elevados en la producción *in vivo* donde las células de los hibridomas individuales se inyectan intra-peritonealmente en ratones Balb/c iniciados prístinos para producir fluido de ascito que contiene altas concentraciones de los mAbs deseados. Abs monoclonales de isotipo IgM o IgG pueden purificarse a partir de tales líquidos ascíticos, o de sobrenadantes de cultivo, utilizando métodos de cromatografía en columna bien conocidos por los expertos en la técnica.

El término "anticuerpo humano" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a esa de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha formado usando cualquiera de las técnicas para formar anticuerpos humanos como se revela en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión de antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la técnica.

Los términos "molécula con la porción de unión a antígeno de un anticuerpo" y "fragmentos de unión a antígeno" como se usa en la presente pretenden incluir no sólo las moléculas de inmunoglobulina intacta de cualquier isotipo y generadas por cualquier línea celular animal o microorganismo, sino también la fracción reactiva de unión a antígeno del mismo, incluyendo, pero sin limitación a, el fragmento Fab, el fragmento Fab', el fragmento F(ab')₂, la porción variable de las cadenas pesada y/o ligera de los mismos, mini-anticuerpos Fab (véase WO 93/15210, la solicitud de patente de EE.UU. 08/256,790, WO 96/13583, la solicitud de patente de EE.UU. 08/817,788, WO 96/37621, la solicitud de patente de EE.UU. 08/999,554, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente como referencia), mini-anticuerpos diméricos biespecíficos (véase Muller et al., 1998) y anticuerpos de cadena sencilla que incorporan esa fracción reactiva, así como cualquier otro tipo de molécula en la que esa fracción reactiva de anticuerpo se ha insertado

físicamente. Dichas moléculas pueden proporcionarse por cualquier técnica conocida, que incluye, pero no se limita a, escisión enzimática, síntesis de péptido o técnicas recombinantes.

La invención también proporciona variantes conservadoras de aminoácidos de las moléculas de anticuerpo según la invención. Las variantes según la invención también pueden formarse para que conserven la estructura molecular general de las proteínas codificadas. Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales que comprenden los productos de proteína revelados, algunas sustituciones racionales serán reconocidas por el trabajador experto. Las sustituciones de aminoácidos, es decir, "las sustituciones conservadoras," pueden formarse, por ejemplo, con base en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. El término "análogo de anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo derivado de otro anticuerpo por una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

El término "variante de anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a cualquier molécula que comprende el anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, las proteínas de fusión en las que el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo se vinculan a otra entidad química se consideran una variante de anticuerpo.

El término "anticuerpo monoclonal no completamente humanizado" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo monoclonal, con dominios variables de una cadena pesada y/o una cadena ligera en los que las secuencias de aminoácidos que flanquean y/o que están inmediatamente adyacentes a los CDRs no son completamente humanos, es decir, no son idénticos a cualquier secuencia homóloga o correspondiente conocida tomada de anticuerpos naturales humanos.

En las formulaciones farmacéuticas y de medicamentos, el agente activo se utiliza preferiblemente junto con uno o más portador(es) farmacéuticamente aceptables y opcionalmente cualesquiera otros ingredientes terapéuticos. El portador(es) debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no indebidamente dañino al receptor del mismo. El agente activo es proporcionado en una cantidad efectiva para lograr el efecto farmacológico deseado, como se describió antes, y en una cantidad apropiada para lograr la dosis diaria deseada.

Típicamente, las moléculas de la presente invención que comprenden la parte de unión a antígeno de un anticuerpo o que comprende otro polipéptido que incluye un mimético de péptido serán suspendidas en una solución salina estéril para usos terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas pueden como alternativa formularse para controlar la liberación del principio activo (molécula que comprende la parte de unión a antígeno de un anticuerpo) o para prolongar su presencia en el sistema de un paciente. Se conocen muchos sistemas de suministro adecuados e

incluyen, por ejemplo, sistemas implantables de liberación de fármaco, hidrogeles, hidroximetilcelulosa, microcápsulas, liposomas, microemulsiones, microesferas, y similares. Las preparaciones de liberación controlada pueden prepararse a través del uso de polímeros para formar un complejo o adsorber la molécula según la presente invención. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(etilen-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebárico. El tasa de liberación de la molécula según la presente invención, es decir, de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de esa matriz depende del peso molecular de la molécula, la cantidad de la molécula dentro de la matriz, y el tamaño de las partículas dispersadas.

La composición farmacéutica de esta invención puede ser administrada por cualquier medio conveniente, tal como oralmente, tópicamente, intranasalmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, intraarterialmente, intraarticularmente, intralesionalmente o parenteralmente. Normalmente, se usa la administración intravenosa (i.v.).

Será evidente para esos con experiencia ordinaria en la técnica que la cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula según la presente invención dependerá, *inter alia* del programa de administración, la dosis unitaria de la molécula administrada, si la molécula se administra en combinación con otros agentes terapéuticos, el estado inmune y la salud del paciente, la actividad terapéutica de la molécula administrada y el juicio del médico tratante. Como se usa en la presente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de una molécula requerida para aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno que se trata durante un periodo de tiempo.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, detener en cierta medida y preferiblemente parar) la infiltración de la célula cancerígena en órganos periféricos; inhibir (es decir, detener en cierta medida y preferiblemente parar) la metástasis de tumor; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerígenas existentes, puede ser citostático o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia in vivo puede, por ejemplo, se mide mediante la evaluación de la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), duración de la respuesta, y/o calidad de vida.

El término "azúcar" se refiere a monosacáridos, disacáridos, y polisacáridos, ejemplos de azúcares incluyen, pero sin limitación a, sacarosa, trehalosa, dextrosa, y otros.

Las moléculas de la presente invención como principios activos se disuelven,

dispersan o mezclan en un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y compatible con el principio activo como es bien sabido. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, salina, salina regulada con fosfato (PBS), dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Otros portadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes reguladores del pH.

La composición farmacéutica según la presente invención puede administrarse junto con una composición antineoplásica. Según una modalidad específica la composición antineoplásica comprende al menos un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico, que puede ser administrado junto con el anticuerpo según la presente invención, o por separado, puede comprender cualquiera de esos agentes conocidos en la técnica que exhiben actividad anticáncer, incluyendo pero sin limitación a: mitoxantrona, inhibidores de topoisomerasa, vincas venenosas al huso: vinblastina, vincristina, vinorelbina (taxol), paclitaxel, docetaxel; agentes de alquilación: mecloretamina, clorambucil, ciclofosfamida, melfalan, ifosfamida; metotrexato; 6-mercaptopurina; 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabin; podofilotoxinas: etopósido, irinotecan, topotecan, dacarbazin; antibióticos: doxorubicina (adriamicina), bleomicina, mitomicina; nitrosoureas: carmustina (BCNU), lomustina, epirubicina, idarubicina, daunorubicina; iones inorgánicos: cisplatina, carboplatina; interferón, asparaginasa; hormonas: tamoxifen, leuprolida, flutamida, y acetato de megestrol.

Según una modalidad específica, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en agentes de alquilación, antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores relacionados, alcaloides vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-asparaginasa, inhibidor de topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, urea sustituida con antracenediona, derivados de metil hidrazina, supresores adrenocorticales, adrenocorticosteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógeno, andrógenos, antiandrógeno, y análogo de la hormona liberadora de gonadotropina. Según otra modalidad, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina (LV), irinotecan, oxaliplatina, capecitabina, paclitaxel y doxetaxel. Pueden usarse dos o más agentes quimioterapéuticos en un cóctel a ser administrado en combinación con la administración del anticuerpo anti-CEACAM1.

El término "tratamiento" como se usa en la presente se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Esos en necesidad de tratamiento incluyen esos que ya tienen el trastorno así como esos en los que puede prevenirse el trastorno.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen pero no están limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.

Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen melanoma, pulmón, tiroides, mama, colon, próstata, hepático, de vejiga, renal, cervical, pancreático, leucemia, linfoma, mieloides, de ovario, útero, sarcoma, biliar, o cáncer de endometrio.

El término "composición anti-neoplásica" se refiere a una composición útil en el tratamiento de cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo capaz de inhibir o prevenir el crecimiento o la función de tumor, y/o causa la destrucción de las células tumorales. Los agentes terapéuticos adecuados en una composición antineoplásica para el tratamiento de cáncer incluyen, pero sin limitarse a, los agentes quimioterapéuticos, isótopos radiactivos, toxinas, citocinas tales como interferones y agentes antagonistas dirigidos citocinas, receptores de citocinas o antígenos asociados a células tumorales. Preferiblemente el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

El término "diagnosticar" como se usa en la presente se refiere a determinar la presencia o ausencia de una patología, clasificar una patología o un síntoma, determinar la gravedad de la patología, monitorear la progresión de la patología, pronosticar un resultado de una patología y/o posibilidades de recuperación.

El término "mutación de residuo de aminoácido" como se usa en la presente se refiere a una sustitución, una inserción, o una delección de un único residuo de aminoácido. El término "mutación restauradora de residuo de aminoácido" como se usa en la presente se refiere a una substitución de un único residuo de aminoácido encontrado en un marco de anticuerpo humano para un correspondiente residuo de aminoácido encontrado en un marco de anticuerpo de murino.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más cabalmente algunas modalidades de la invención. Sin embargo, no se deben considerar limitativos en modo alguno del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS

CUADRO 1

Secuencias CDR Un mAb humanizado según la presente invención comprende los siguientes seis CDRs

V_L CDR3	V_L CDR2	V_L CDR1	V_H CDR3	V_H CDR2	V_H CDR1
QQGKSLPR T SEQ ID NO: 6	YTSRLHS SEQ ID NO: 5	RTSQDIGNYL N SEQ ID NO: 4	GDYYGGFAVD Y SEQ ID NO: 3	VINPGSGDTN YNEKFKG SEQ ID NO: 2	GYAFTNNLIE SEQ ID NO: 1

CUADRO 2**Secuencias no de CDR de regiones variables completamente murinas y completamente humanas**

	CDR3-X	CDR2-X-CDR3	CDR1-X-CDR2	X-CDR1	Cadena
5	WGQGTSVTVS S (SEQ ID NO: 39)	KATLTADKSSNTAYMQL SSLTSDDSAVYFCAR (SEQ ID NO: 38)	WVKQRPGQGLEW G (SEQ ID NO: 37)	QVQLQQSGAEL VRPGTSVKVSC KAS (SEQ ID NO: 36)	Murino H
10	WGQGTTTVTS S (SEQ ID NO: 10)	RVTMTRDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 9)	WVRQAPGQGLEW MG (SEQ ID NO: 8)	QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC AS (SEQ ID NO: 7)	Humano H
	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 43)	GVPSRFSGSGSGTDYSLT ISNLEQEDIATYFC (SEQ ID NO: 42)	WYQQKPDGTVKLL IY (SEQ ID NO: 41)	DIQMTQTTSSL SASLGDRVITISC (SEQ ID NO: 40)	Murino L
15	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTDFTF ISSLPEDIATYYC (SEQ ID NO: 13)	WYQQKPGKAPKLLI Y (SEQ ID NO: 12)	DIQMTQSPSSL SASVGDRTITC (SEQ ID NO: 11)	Humano L

CUADRO 3**Secuencias no de CDR de regiones variables de cadena pesada humanizadas con mutación restauradora**

	CDR3-X	CDR2-X-CDR3	CDR1-X-CDR2	CDR2-X-CDR3	Variante
20	WGQGT <u>S</u> TVTS S (SEQ ID NO: 23)	<u>R</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> (SEQ ID NO: 18)	WV <u>K</u> QAPGQGLEW <u>I</u> G (SEQ ID NO: 16)	QVQLVQSGAEL <u>L</u> KKP GASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 15)	VH1
25	WGQGTTTVTS S (SEQ ID NO: 10)	<u>R</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> (SEQ ID NO: 19)	WV <u>K</u> QAPGQGLEW <u>I</u> G (SEQ ID NO: 16)	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 7)	VH2
	WGQGTTTVTS S (SEQ ID NO: 10)	<u>R</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> (SEQ ID NO: 20)	WVRQAPGQGLEW <u>I</u> G (SEQ ID NO: 17)	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 7)	VH3
30	WGQGTTTVTS S (SEQ ID NO: 10)	<u>R</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> (SEQ ID NO: 21)	WVRQAPGQGLEW <u>I</u> G (SEQ ID NO: 17)	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 7)	VH4
	WGQGTTTVTS S (SEQ ID NO: 10)	RVTMT <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> (SEQ ID NO: 22)	WVRQAPGQGLEW <u>I</u> G (SEQ ID NO: 17)	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 7)	VH5

* los aminoácidos en negritas y subrayados con las mutaciones restauradoras a la secuencia de murino.

CUADRO 4**Secuencias no de CDR de regiones variables de cadena ligera humanizadas con mutación restauradora**

	CDR3-X	CDR2-X-CDR3	CDR1-X-CDR2	X-CDR1	Variante
5	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTD Y T L TISSLQ Q EDIAT Y F C (SEQ ID NO: 25)	WYQQKPGKA V KL LIY (SEQ ID NO: 24)	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 11)	VL1
	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTD Y T L TISSLQ P EDIAT Y F C (SEQ ID NO: 26)	WYQQKPGKA V KL LIY (SEQ ID NO: 24)	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 11)	VL2
10	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTD Y T F TISSLQ P EDIAT Y F C (SEQ ID NO: 27)	WYQQKPGKA V KL LIY (SEQ ID NO: 24)	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITC (SEQ ID NO: 11)	VL3

* los aminoácidos en negritas y subrayados con las mutaciones restauradoras a la secuencia de murino.

CUADRO 5**Secuencias no de CDR de regiones variables humanizadas con mutación restauradora**

	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Regiones variables
20	28	SEQ ID NO: 15 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 16 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 23	Región variable de cadena pesada #1
	29	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 16 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 19 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10	Región variable de cadena pesada #2
	30	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 20 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10	Región variable de cadena pesada #3
25	31	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10	Región variable de cadena pesada #4
	32	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 22 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10	Región variable de cadena pesada #5
30	33	SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 25 - SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 14	Región variable de cadena ligera #1
	34	SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 14	Región variable de cadena ligera #2
35	35	SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 14	Región variable de cadena ligera #3

La secuencia de la cadena pesada completamente humanizada de referencia (SEQ ID NO: 57), a la que se introducen las mutaciones restauradoras se compone de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 7)- GYAFTNNLIE (SEQ ID NO: 1)-
WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO: 8)- VINPGSGDTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 2)-
5 RVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 9)- GDYYGGFAVDY (SEQ ID NO: 3)-
WGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 10).

La secuencia de la cadena ligera completamente humanizada de referencia (SEQ ID NO: 58), a la que se introducen las mutaciones restauradoras se compone de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)- RTSQDIGNYLN (SEQ ID NO: 4)-
10 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)- YTSRLHS (SEQ ID NO: 5)-
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYC (SEQ ID NO: 13)- QQGKSLPRT (SEQ ID NO: 6)-
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)

EJEMPLO 1

Diseño de las secuencias de la región variable del anticuerpo injertado con CDR

Los modelos estructurales de las regiones V del anticuerpo quimérico anti-CEACAM-1 se produjeron usando Swiss PDB y se analizaron para identificar los aminoácidos en los marcos de la región V que pueden ser importantes para las propiedades de unión del anticuerpo (Figura 1). Estos aminoácidos se indicaron para la incorporación en uno o más anticuerpos injertados con la CDR variante. Tanto las secuencias de V_H como de V_K de CM-10 contienen residuos de marco típicos y los motivos de CDR 1, 2 y 3 se comparan a muchos anticuerpos de murino. Las CDRs se tomaron directamente de la secuencia de murino. Entonces se analizaron los modelos Swiss PDB, junto con homologías de ratón/humano en posiciones críticas, para resaltar las regiones de marco y los
25 residuos individuales que pudieran impactar potencialmente en la presentación de las CDRs.

Diseño de Variantes

La secuencia de aminoácidos de la región V de cadena pesada y ligera se comparó contra una base de datos de las secuencias de la región V de línea germinal humana para identificar
30 las secuencias humanas de cadena pesada y ligera con el mayor grado de homología para uso como marcos de región V. Se diseñó una serie de regiones V de cadena pesada y ligera al injertar CDRs sobre los marcos y, si fue necesario, por mutación restauradora a la secuencia de residuos de murino identificada antes como potencialmente crítica para la restauración de la eficiencia de unión del anticuerpo quimérico. Se consideró que se necesitaba retener un número pequeño de residuos
35 de ratón en cada variante. Las secuencias variantes con la incidencia más baja de epítomos de

linfocitos T potenciales se seleccionó entonces según se determinó aplicando las tecnologías in-silico propiedad de Antitope, iTope™ y TCED™ (Base de datos de epítipo de linfocitos T) (Perry et al 2008, Bryson et al 2010). El número de mutaciones restauradoras se determinó por la secuencia de inicio de murino. Del análisis estructural, se identificó un máximo de 13 posiciones en el V_H y se identificaron 5 posiciones en el V_K como residuos que podrían ser estructuralmente importantes. Estos se priorizaron y se diseñaron las variantes que incorporaron números variables de estas. Aunque no hay un límite teórico al número de mutaciones restauradoras, a más mutaciones restauradoras incorporadas, menos humana será la secuencia. Se diseñaron cinco cadenas V_H y tres cadenas V_K con las secuencias establecidas en SEQ ID NOs: 28 a 35.

iTope™ y TCED™

El software iTope™ predice las interacciones favorables entre las cadenas secundarias de aminoácidos de un péptido y bolsillos de unión específicos (en particular posiciones de bolsillo; p1, p4, p6, p7 y p9) dentro de las ranuras de unión de 34 alelos de MHC clase II humano. La ubicación de los residuos de unión clave se logra por la generación *in silico* de péptidos 9mer que se superponen por un aminoácido expandiendo la secuencia de la proteína de prueba. Las comparaciones internas con los experimentos de unión de MCH clase II física ha demostrado que puede usarse el iTope™ para discriminar exitosamente con alta precisión entre péptidos que se unen o no a las moléculas de MHC clase II. Sin embargo, los resultados pueden evaluarse a la luz del hecho de que todos los métodos predictivos para la unión a MHC clase II sobrepredicen inherentemente el número de epítopos de linfocitos T ya que no permiten otros procesos importantes durante la presentación del antígeno tal como el procesamiento de proteína/péptido, reconocimiento por el receptor del linfocito T o la tolerancia del linfocito T al péptido.

El TCED™ contiene las secuencias de todos los péptidos investigados previamente en los ensayos de mapeo de epítipo de linfocito T EpiScreen™. El TCED™ se usa para buscar cualquier secuencia de prueba contra una base de datos grande (>10,000 péptidos) de péptidos por búsqueda BLAST para específicamente seleccionar segmentos que han demostrado previamente no estimular las respuestas de linfocitos T. Además, se descartó cualquier región con homología significativa a los epítopos del linfocito T en la base de datos.

Construcción de Variantes injertadas a CDR

Todos los genes de región V_H y V_K injertados en CDR para CM-10 se sintetizaron usando una serie de oligonucleótidos superpuestos que se fijaron, ligaron y amplificaron por PCR para dar regiones V sintéticas de longitud completa. Las variantes ensambladas entonces se clonaron directamente en un sistema de vector de expresión para las cadenas V_H y cadenas V_K de

IgG1 e IgG4 (S241P). Todos los constructos se confirmaron por secuenciación.

Construcción, expresión y Purificación de anticuerpos

Los genes de anticuerpo quimérico y todas las combinaciones de cadenas V_H y V_K injertadas en CDR (es decir, un total de 15 apareamientos para cada uno de IgG1 y IgG4 (S241P)) se transfectaron transitoriamente en células HEK293-EBNA (ATCC no. cat. CRL-10852) usando fosfato de calcio. Las transfecciones transitorias se incubaron por hasta cinco días antes de cosechar los sobrenadantes.

Los anticuerpos quiméricos y las variantes injertadas en CDR de CM-10 se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular transitorio en una columna de sefarosa de Proteína A (GE Healthcare no. cat. 110034-93), intercambiada con regulador en 1X PBS pH 7.4 y cuantificada por OD_{280nm} usando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos predicha ($E_{c(0.1\%)} = \sim 1.37-1.40$ para el anticuerpo quimérico CM-10 y las variantes). Los anticuerpos quiméricos y las variantes humanizadas principales se analizaron por reducción en SDS-PAGE. Las bandas correspondientes a los tamaños predichos de las cadenas V_H y V_K se observaron sin evidencia de cualquier contaminación (Figura 2).

EJEMPLO 2

Competencia de unión de los anticuerpos purificados a CEACAM-1 humana

La unión del anticuerpo quimérico purificado CM-10 junto con los anticuerpos quiméricos y cada una de las variantes injertadas en CDR a la CEACAM-1 humana recombinante se evaluaron en un ELISA competitivo. Una dilución en serie (tres veces) de los anticuerpos humanizados o quiméricos a partir de 20 $\mu\text{g/ml}$ a 0.009 $\mu\text{g/ml}$ se premezcló con una concentración constante de quimérico biotinilado CM-10 (0.005 $\mu\text{g/ml}$, concentración final) antes de incubar por 1 hora a temperatura ambiente en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pozos Nunc Immuno MaxiSorp (Fisher no. cat. DIS-971-030J) se pre-revistieron con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de CEACAM-1 humana recombinante (R&D Systems no. cat. 2244-CM-050) se diluyó en 1X PBS pH 7.4. La unión del anticuerpo biotinilado se detectó con estreptavidina-HRP (Sigma no. cat. S5512) y sustrato de TMB (Invitrogen no. cat. 00-2023). Se detuvo la reacción con HCl 3M, se leyó la absorbancia a 450nm en un lector de placa Dynex Technologies MRX TC II y se graficaron las curvas de unión.

Todas las variantes humanizadas dieron perfiles de unión similares al CM-10 quimérico con las curvas de unión mostradas en la Figura 3. Estos datos se usaron para calcular los valores de IC_{50} para cada anticuerpo y se normalizaron al IC_{50} del CM-10 quimérico como se incluyó en cada ELISA y como se muestra en los Cuadros 6 y 7.

CUADRO 6**Valores de IC₅₀ para las variantes de anti-CEACAM-1 humanizada**

	Construceto	IC ₅₀ [IgG] µg/mL	
		Variantes de IgG1	Variantes de IgG4 (S241P)
5	VH1/VK1	0.78	0.78
	VH1/VK2	0.70	0.70
	VH1/VK3	0.77	0.54
	VH2/VK1	0.68	0.43
	VH2/VK2	0.78	0.76
	VH2/VK3	0.76	0.71
10	VH3/VK1	0.69	0.71
	VH3/VK2	0.85	0.77
	VH3/VK3	0.86	0.73
	VH4/VK1	0.73	0.69
	VH4/VK2	0.78	0.69
	VH4/VK3	0.99	0.63
15	VH5/VK1	0.77	0.74
	VH5/VK2	0.72	0.70
	VH5/VK3	0.74	0.70

CUADRO 7**Valores de IC₅₀ relativos calculados para las variantes de anti-CEACAM-1 humanizada**

	Construceto	IC ₅₀ normalizado para CM-10	
		Variantes de IgG1	Variantes de IgG4
20	VH1/VK1	1.46	1.52
	VH1/VK2	1.32	1.36
	VH1/VK3	1.44	1.05
	VH2/VK1	1.29	0.84
25	VH2/VK2	1.24	1.26
	VH2/VK3	1.21	1.16
	VH3/VK1	1.10	1.16
	VH3/VK2	1.36	1.26
	VH3/VK3	1.37	1.23
30	VH4/VK1	1.15	1.15
	VH4/VK2	1.24	1.17
	VH4/VK3	1.56	1.06
	VH5/VK1	1.17	1.23
	VH5/VK2	1.09	1.16
	VH5/VK3	1.12	1.17

Los datos normalizados de IC₅₀ mostraron un intervalo de 0.84 a 1.56 para todas las variantes probadas indicando que las eficiencias de unión de todos los anticuerpos injertados a CDR

para la CEACAM-1 humana fueron comparables a esos del CM-10 quimérico.

EJEMPLO 3

Combinación de mAb humanizado para CEACAM1 y anticuerpos anti PD-1/PD-L

5

A. Se demostraron los efectos sinérgicos de los anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en la citotoxicidad de células TIL humanas contra células de melanoma humano. Las células de cáncer de melanoma humano (MALME 3M) se cultivaron en la presencia de IFN- γ para inducir la expresión de PD-L1. Las células TIL humanas (TIL14) se incubaron con un anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humano (CM-24) (0.01 μ g/ml, 0.05 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml), un anticuerpo monoclonal para PD-1 humano (clon E12.2H7) o con una combinación de ambos anticuerpos (0.005, 0.025, 0.05 y 0.25 μ g/ml de cada anticuerpo) durante 30 minutos a 37°C. Las células de cáncer de melanoma humano tratadas con IFN- γ se agregaron para incubación durante la noche, antes de la evaluación de citotoxicidad. La figura 4 demuestra que los anticuerpos anti-CEACAM1 y los anticuerpos anti-PD-1 son capaces de unir sus objetivos respectivos en los linfocitos en humanos respectivos tales como células TIL, y que esta unión aumenta significativamente la toxicidad de las células TIL humanas contra las células de cáncer humano sobre cada monoterapia sola. Por lo tanto se concluyó que al proteger a los linfocitos de señales inmunosupresoras de las células de cáncer objetivo resulta en una citotoxicidad sustancial hacia esas células de cáncer.

20

B. También se demostraron los efectos sinérgicos de los anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en los niveles de Granzima B y la citotoxicidad de células TIL humanas contra células de melanoma humano cuando se agregan anticuerpos anti-PD-1 antes de la adición de anticuerpos anti-CEACAM1: Las células de cáncer de melanoma humano (MALME 3M) se cultivaron en la presencia de IFN- γ para inducir la expresión de PD-L1. Se incubaron células TIL humanas (TIL14) sólo con medio (negro), anticuerpo IgG no específico (0.8 μ g/ml, blanco), varias concentraciones (0.05 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 0.4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml) de CM-24, un mAb para PD-1 humano (clon E12.2H7) o una combinación de ambos anticuerpos (0.05 μ g/ml cada uno, 0.1 μ g/ml cada uno, 0.2 μ g/ml cada uno, 0.4 μ g/ml cada uno, 0.8 μ g/ml cada uno). El anticuerpo monoclonal para PD-1 humano se agregó primero por 30 minutos a 37°C, seguido de la adición del mAb para CEACAM1 humana. Las células de cáncer de melanoma humano tratadas con IFN- γ se agregaron para incubación durante la noche, antes de la evaluación de citotoxicidad. El índice de combinación (CI) se calculó que es 0.15. En el mismo ensayo, el nivel de la proteína citotóxica Granzima B que se secreta con la activación de la célula citotóxica, se evaluó por el Kit ELISA de Granzima B comercial. Las figuras 5A y 5B demuestran que los anticuerpos anti-CEACAM1 y anticuerpos anti-PD-1 son capaces de unir sus respectivos objetivos en linfocitos humanos tal como

35

las células TIL, y que esta unión aumenta la secreción de Granzima B y toxicidad de células TIL humanas contra las células cancerosas humanas. Las Figuras 5A y 5B indican de nuevo que proteger los linfocitos de señales inmunosupresoras de las células de cáncer objetivo resulta en una citotoxicidad sustancial hacia las células de cáncer objetivo y sugiere que la programación podría ser un factor crítico en la terapia combinada.

C. También se demostraron los efectos sinérgicos de los anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en los niveles de Granzima B y la citotoxicidad de células TIL humanas contra células de melanoma humano cuando se agregan anticuerpos anti-PD-1 antes de la adición de anticuerpos anti-CEACAM1 (no se muestran los datos): Las células de melanoma humano (MALME 3M) se cultivaron en la presencia de IFN- γ para inducir la expresión de PD-L1. Las células TIL humanas (TIL14) se incubaron sólo con medio (negro), anticuerpo IgG no específico (0.8 μ g/ml, blanco), varias concentraciones (0.05 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 0.4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml) de un anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humana (CM-24), un anticuerpo monoclonal para PD-L1 humano (clon 29E.2A3) o una combinación de ambos anticuerpos (0.05 μ g/ml de cada uno, 0.1 μ g/ml de cada uno, 0.2 μ g/ml de cada uno, 0.4 μ g/ml de cada uno, 0.8 μ g/ml de cada uno). El anticuerpo anti-PD-L1 se añadió primero durante 30 minutos a 37°C, seguido de la adición del anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humana. Las células de cáncer de melanoma humano tratadas con IFN- γ se agregaron para incubación durante la noche, antes de la evaluación de citotoxicidad. El índice de combinación (CI) se calculó que es 0.67. Los resultados representan un promedio de % de citotoxicidad $\pm$ SE como se determina por ensayo de liberación de LDH clásico de pozos por triplicado por tratamiento. *P <0.05 Prueba T emparejada en comparación con sólo un PD-L1. En el mismo ensayo, el nivel de la proteína citotóxica Granzima B que se secreta con la activación de la célula citotóxica, se evaluó por el Kit ELISA de Granzima B comercial. Los resultados representan el nivel de Granzima B promedio de pozos triplicados por tratamiento. Los resultados demuestran que los anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-L1 son capaces de unirse a sus objetivos respectivos en linfocitos humanos (tales como células TIL) y en células de cáncer humano (tales como células de melanoma), y que esta unión aumenta la secreción de Granzima B y la toxicidad de las células TIL humanas contra células de cáncer humano. Se demostró además que el bloqueo de las interacciones de PD-1/PD-L1 y CEACAM1/CEACAM1 puede resultar en un efecto sinérgico y que proteger a los linfocitos de la señal inmunosupresora de PD-1^{linfocito}/PD-Ligando^{célula de cáncer} resulta en una citotoxicidad sustancial hacia esas células de cáncer, independientemente del antígeno objetivo, ya sea PD-1, PD-L1 o PD-L2.

D. Efectos sinérgicos de anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en la citotoxicidad de células LAK humanas contra células de melanoma humano cuando se agregan anticuerpos anti-PD-1 antes de la adición de anticuerpos anti-CEACAM1. Las células de melanoma

humano (SKMEL28, positivo a CEACAM1, positivo a PD-L1) se cultivaron en la presencia de IFN- α para inducir la expresión de PD-L1. Las células LAK humanas (asesino activado con linfocina) generadas por la activación de PBMCs de un donador humano saludable con IL-2 (500 unidades/ml) por 7 días se incubaron con medio solamente (negro), anticuerpo IgG no específico (0.8 μ g/ml, 5 blanco), varias concentraciones (0.1 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 0.4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml) de un anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humano (CM-24), un anticuerpo monoclonal para PD-1 humano (clon E12.2H7) o una combinación de ambos anticuerpos (0.1 μ g/ml de cada uno, 0.2 μ g/ml de cada uno, 0.4 μ g/ml de cada uno, 0.8 μ g/ml de cada uno). Se añadió el anticuerpo monoclonal para PD-1 humana primero durante 30 minutos a 37°C, seguido de la adición del anticuerpo monoclonal para 10 CEACAM1 humana. Las células de melanoma humano tratadas con IFN- α se agregaron para incubación de 24 horas, antes de la evaluación de citotoxicidad. La figura 6 demuestra que los anticuerpos anti-CEACAM1 y anticuerpos anti-PD-1 son capaces de unir sus respectivos objetivos en linfocitos humanos activados tal como células LAK, y que esta unión aumenta la toxicidad de las células LAK humanas contra células cancerosas humanas. Se calculó el índice de combinación (CI) 15 para ser < 0.8. La figura 6 además demuestra que la unión de estos anticuerpos a las células LAK está de alguna manera interrelacionada, justificando un estudio adicional de su mecanismo de unión, y que este mecanismo está presente en gran variedad de linfocitos activados.

E. El tratamiento con anticuerpos anti-CEACAM1 aumenta la expresión de PD-L1 en las células objetivo de cáncer. Las células NK humanas (NK92MI) se incubaron con o sin 20 anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humana (10 μ g/ml CM-24), seguidas por la adición de células cancerosas de melanoma humanas (SKMEL28). Las células se incubaron durante 24, 48 y 72 horas y los niveles de PD-L1 se midieron en cada punto de tiempo por análisis de FACS. Los niveles de relación media de anti-PD-L1 en comparación a un isotipo de control adecuado para los tratamientos indicados en diferentes puntos de tiempo se muestran en la Figura 7 demostrando que la expresión 25 de CEACAM1 y PD-L1 en células de cáncer está en verdad relacionada. La adición de anticuerpos anti-CEACAM1 resulta en la expresión de PD-L1 incrementada en células cancerosas supervivientes así proporcionando soporte adicional para el tratamiento combinado con ambos agentes. Por lo tanto puede ser beneficioso tratar el cáncer mediante la primera administración de anticuerpos anti-CEACAM1, y luego la administración adicional de anticuerpos anti-PD-L1 y/o anti-PD-L2, ya que el 30 número de proteínas PD-L1 en las células de cáncer permanece relativamente alto, haciendo a las células más sensibles para el tratamiento de anticuerpos PD-1/PD-L1, lo que implica que la terapia combinatoria puede mejorar el resultado clínico. La administración de diferentes anticuerpos en tiempos separados, más que concurrentemente, maximiza el efecto citotóxico de los linfocitos contra las células de cáncer. Sin estar unido a cualquier teoría o mecanismo, este hallazgo puede unirse con 35 otro sorprendente hallazgo de la presente invención, de acuerdo con el tratamiento con anticuerpos

anti-CEACAM1 aumenta la expresión de PD-L1 en células cancerosas objetivo. Hipotéticamente, esto apoyaría la necesidad de una pluralidad de anticuerpos para obtener eficacia mejorada de los linfocitos citotóxicos. Puede ser visualizado que la administración de anticuerpos anti-PD-1 bloquea primero las moléculas de PD-1 en linfocitos, la posterior administración de anticuerpos anti-CEACAM1 bloquea las moléculas CEACAM1 en linfocitos y/o células cancerosas objetivo y aumenta la expresión de ligandos de PD-1 en células cancerosas objetivo. Sin embargo, puesto que las moléculas de PD-1 en linfocitos ya están bloqueadas, los niveles de expresión elevados de ligandos de PD-1 en células cancerosas objetivo no impiden a los linfocitos de ejercer eficientemente su potencial citotóxico completo.

10 F. Los efectos sinérgicos de anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1 en la progresión tumoral en ratones inmuno-competentes. Se injertaron células de linfoma de murino (5×10^6 , A20) en el abdomen de ratones Balb/C por inyección subcutánea en el Día 1. En el día 10, los tumores alcanzaron un volumen promedio de 45 mm^3 , y los ratones se asignaron aleatoriamente en 4 grupos separados (11-12 ratones por grupo), y se les administró intravenosamente ya sea PBS, 15 CC-1 (anticuerpo anti-CEACAM1 de murino, 6mg/kg, PRM-1 (anticuerpo anti-PD-1 de murino, 6mg/kg) o una combinación de CC-1 y PRM-1 (6mg/kg cada uno). Los tratamientos se repitieron en los días 15 y 20. El efecto de un anticuerpo monoclonal para CEACAM1 humana sola, un anticuerpo monoclonal para PD-1 humana sola, y una combinación de ambos anticuerpos en inhibición del crecimiento tumoral se siguió. Los ratones Balb/C inmuno-competentes se seleccionaron para este 20 experimento para permitir la evaluación de la actividad biológica de los anticuerpos anti-CEACAM1 de murino y anti-PD-1 de murino en ratones con sistema inmune intacto y para evaluar la reacción del sistema inmune contra las células de cáncer de murino. En su conjunto, este modelo simula terapias en seres humanos, en las que los pacientes con cáncer recibirían combinaciones de anticuerpos anti-humano-CEACAM1 y anti-humano-PD-1/PD-L1/PD-L2. Sin estar unido a una teoría o mecanismo, se 25 presume que una combinación de anticuerpos anti-CEACAM1 y anti-PD-1/PD-L1/PD-L2 podría prohibir a las células de cáncer que evitar la activación y citotoxicidad del sistema inmune del paciente, produciendo así una respuesta anti-cáncer significativa. La figura 8 demuestra que los anticuerpos anti-CEACAM1 y los anticuerpos anti-PD-1/PD-L1/PD-L2 son capaces de unir sus objetivos respectivos en las células tumorales y/o células inmunes *in vivo*, y que esta unión 30 combinada atenúa significativamente la progresión del tumor en comparación con cada monoterapia. Este resultado es muy importante, ya que da testimonio de la eficacia y el potencial del uso de una anti-CEACAM1 y anti-PD-1/PD-L1/PD-L2 combinadas incluso en tumores establecidos de volúmenes considerables, que imitan el ajuste clínico donde los pacientes con tumores establecidos son tratados.

EJEMPLO 4**Tratamiento de Combinación con mAb humanizado para CEACAM1 y células LAK**

A. Los anticuerpos anti-CEACAM1 aumentan la citotoxicidad de células LAK humanas contra células de melanoma humano. Se aislaron células PBMC de un donador sano seguido por la activación con IL-2 (500 o 1000 unidades/ml) por 3 días para generar una población de células LAK humanas. Entonces, las células LAK humanas se incubaron con 0.1µg/ml, 0.5µg/ml, 2.5µg/ml, 5µg/ml o 10µg/ml de un anticuerpo anti-CEACAM1 (CM-24) por 30 minutos a 37°C. Se agregaron las células de melanoma humano (SKMEL28) para una incubación de 24 horas, después de lo cual se determinó la citotoxicidad. La Figura 9 demuestra que aunque las células LAK humanas son citotóxicas a las células de cáncer de melanoma humano por sí mismas (compare por ejemplo, dos barras a la izquierda), la adición de anticuerpos anti-CEACAM1 aumenta significativamente la citotoxicidad esas células de cáncer de melanoma humano en una manera dependiente de la dosis.

B. Los anticuerpos anti-CEACAM1 aumentan la citotoxicidad de las células LAK humanas contra una variedad de células de cáncer humano pancreático y de pulmón. Se aislaron las células PBMC de un donador sano seguido por la activación con IL-2 (500 unidades/ml) por 7 días para genera una población de células LAK humanas. Entonces, las células LAK humanas se incubaron con 0.1µg/ml a 10µg/ml de un anticuerpo anti-CEACAM1 (CM-24) según se indica, por 30 minutos a 37°C. Tres diferentes células de cáncer pancreático humano, T3M4, SU8686 y PANC2, y dos diferentes células de cáncer de pulmón humano, H358 y H460, se agregaron para una incubación de 24 horas. La Figura 10 demuestra que aunque las células LAK humanas son citotóxicas a las células de cáncer pancreático humano T3M4 por sí mismas, la adición de anticuerpos anti-CEACAM1 aumenta significativamente la citotoxicidad a esas células de cáncer humano en una manera dependiente de la dosis. Se obtuvieron resultados similares para otras células de cáncer pancreático y de pulmón.

C. Los anticuerpos anti-CEACAM1 mejoran la secreción de la granzima B de las células LAK humanas en la presencia de células de cáncer pancreático y de pulmón humano. Las células LAK humanas se incubaron con un anticuerpo anti-CEACAM-1 (CM-24) en diferentes concentraciones por 30 minutos a 37°C. Las células de cáncer pancreático humano T3M4 (A) o células de cáncer de pulmón humano H358 (B) entonces se añadieron para una incubación de 24 horas. La secreción de Granzima B se midió por ELISA. Los resultados demuestran que aunque las células LAK humanas producen altos niveles de Granzima B por sí mismas, la adición de anticuerpos anti-CEACAM1 aumenta significativamente los niveles de Granzima B en una manera dependiente de la dosis.

D. Los anticuerpos anti-CEACAM1 mejoran la secreción de IFN-γ de células LAK

humanas en la presencia de células de cáncer humano. Las células LAK humanas se incubaron con un anticuerpo anti-CEACAM-1 (CM-24) en diferentes concentraciones por 30 minutos a 37°C. Luego se agregaron las células de cáncer de pulmón humano H358 o H460 para una incubación de 24 horas. Se midió la secreción de IFN- γ por ELISA. Las Figuras 11A y 11B demuestran que aunque las células LAK humanas producen altos niveles de IFN- γ por sí mismas, la adición de anticuerpos anti-CEACAM1 aumenta significativamente los niveles de IFN- γ en una manera dependiente de la dosis.

EJEMPLO 5

La expresión de CEACAM1 se correlaciona con la presencia de mutaciones de B-Raf en células de cáncer

A. Evaluando las muestras de biopsia de 24 pacientes con cáncer de Melanoma para los niveles de expresión de CEACAM1 y para el genotipo *BRAF* se reveló que hay una correlación de significancia estadística entre la mutación de B-Raf V600E y la expresión de CEACAM1. Más específicamente, aunque sólo 50% (3/6) de las células de melanoma con un B-raf de tipo silvestre, es decir, una valina en la posición 600, expresó niveles detectables de CEACAM1 (Ct de 36 y menor), 100% (18/18) de las células de melanoma con un B-Raf mutado, es decir, un ácido glutámico en la posición 600, expresó niveles detectables de CEACAM1 (Ct de 36 y menor).

B. Tinción extracelular de CEACAM1 de células de cáncer tratadas con B-Raf o inhibidores MEK. 1.0×10^6 células de una muestra de células B-Raf W.T. (076mel) y dos muestras de células B-Raf V600E (526mel, 624mel) se incubaron con diferentes concentraciones de vemurafenib o selumetinib (0.1 μ M o 1 μ M) por 2 a 48 horas. En cada punto de tiempo, se determinó la expresión de CEACAM1 en las células por FACS. Se usaron volúmenes equivalentes de DMSO (vehículo) como control. Los resultados demostraron que aunque el vemurafenib 0.1 μ M y 1 μ M no tuvieron ningún efecto los niveles de expresión de CEACAM1 en células con W.T. B-Raf (076mel), el vemurafenib 0.1 μ M y 1 μ M tuvo un efecto dependiente de la dosis en los niveles de expresión de CEACAM1 en células con B-Raf mutado (526mel, 624mel). Los resultados demuestran además que el selumetinib tuvo un efecto similar al vemurafenib en células con B-Raf mutado (526mel, 624mel), y que aunque el selumetinib 1 μ M disminuyó apreciablemente los niveles de expresión de CEACAM1 en células con W.T. B-Raf pero N-Ras mutado (sk-mel-2), el vemurafenib 1 μ M no tuvo efecto en los niveles de expresión de CEACAM1. Estos resultados apoyan además la regulación de CEACAM1 a través de la trayectoria de MAPK activada constitutivamente, que es impulsada en este caso por el N-Ras mutado, y no por el B-Raf mutado.

C. Las células de cáncer resistentes al inhibidor muestran un aumento en la expresión de CEACAM1 y restauración de la actividad de la trayectoria MAPK. Dos muestras de

células B-Raf V600E sensibles a vemurafenib (526mel, 624mel) y líneas celulares resistentes a vemurafenib derivadas de las mismas se incubaron por 2 días con vemurafenib 1 μ M. Entonces se analizaron las células para la expresión de la proteína CEACAM1 por FACS como se describió antes. Se generaron las líneas celulares resistentes a vemurafenib por un aumento gradual de la concentración del inhibidor en el cultivo, hasta 0.32 $\cdot$ M. Se demostró que las líneas celulares resistentes a vemurafenib expresaron mayores niveles de CEACAM1 que las líneas celulares sensibles a vemurafenib. Se midió la actividad MAPK en muestras celulares B-Raf V600E (624mel) sensibles a vemurafenib y resistentes a vemurafenib por inmunotransferencia para ERK1/2 (pERK fosforilado, Thr202/Tyr204), ERK1/2 total y actina después de 24 horas de exposición al vemurafenib 160 nM. En las células B-Raf V600E sensibles a vemurafenib el vemurafenib elimina casi por completo la fosforilación de ERK1/2, en donde la actividad de MAPK se vio prácticamente interrumpida por el vemurafenib en las células de B-Raf V600E resistentes a vemurafenib.

D. Las células de cáncer resistentes al inhibidor sobre regulan la expresión de CEACAM1. Se cultivaron células de melanoma de B-Raf V600E 526mel en la presencia de vemurafenib 1 μ M. El cultivo se realizó en RPMI 1640 suplementado con Na-Piruvato 1 mM, Pen-Strep 1 mM, 1-Glutamina 1 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM, y suero de becerro fetal inactivado por calor al 10%. La concentración inicial de vemurafenib fue 0.01 del IC₅₀ determinado (0.64 nM). Cada semana, la concentración se duplicó hasta 5 veces el IC₅₀ (320 nM), para generar las células de melanoma resistentes a vemurafenib. Luego las células se probaron para la expresión de CEACAM1 usando MRG1 (anticuerpo de murino para CEACAM1 humana) en citometría de flujo como se describió antes. El ARN total se extrajo con TRIZOL y se generó ADNc con una transcriptasa inversa, según los protocolos de rutina. Aunque el vemurafenib sub regula la expresión de CEACAM1 en células de melanoma B-Raf V600E, estas células sobre regulan los niveles de expresión de CEACAM1 al adquirir resistencia al vemurafenib. Es importante apreciar que los niveles de CEACAM1 en las células de melanoma B-Raf V600E después de adquirir resistencia a vemurafenib son mayores que los niveles en CEACAM1 en células de melanoma B-Raf V600E sin tratar (sin tratamiento de vemurafenib).

E. Las células de cáncer resistentes a inhibidor sobre regulan la expresión de ambos tipos de CEACAM1. Las células de melanoma B-Raf V600E 526mel resistentes a vemurafenib y sensibles a vemurafenib mencionadas antes se probaron para el tipo de CEACAM1 sobre-expresado al adquirir resistencia a vemurafenib por qPCR. Los datos presentados en las Figuras 12A y 12B demuestran que la expresión de ambos tipos de CEACAM1, CEACAM1-largo (12A) y CEACAM1-corto (12B) se sobre regula aproximadamente tres veces más en las células resistentes a vemurafenib en comparación a las células sensibles a vemurafenib.

F. Los inhibidores de B-Raf/MEK aumentan la citotoxicidad inducida por los

linfocitos T. Dos muestras de células B-Raf V600E sensibles a vemurafenib (526mel, 624mel) se examinaron para viabilidad en la presencia de linfocitos T citotóxicos, con o sin vemurafenib 10M. Las células de melanoma se pre-incubaron con vemurafenib 10M y luego se co-incubaron durante la noche con linfocitos T apareados con HLA-A2 y apareados con antígeno en una relación de efector-objetivo de 5:1. La eliminación celular se determinó por la liberación de LDH. Se demostró que el vemurafenib sensibilizó apreciablemente las células de melanoma a los linfocitos T citotóxicos. Los inhibidores de B-Raf/MEK y anticuerpos para CEACAM1 aumentaron la citotoxicidad inducida por los linfocitos T para las células de cáncer *in vitro*.

EJEMPLO 6

El efecto anticáncer de CM-24 a diferentes dosis *in vivo*

Se injertaron ratones SCID-NOD IV con 5×10^6 células de melanoma (líneas celulares MEL526) y se trataron por 44 días según los grupos de tratamiento indicados en las Figuras 13A a 13C. Se dieron los anticuerpos dos veces por semana por inyección IV y se administró TIL 10×10^6 IV cada 10 días. En el día 49 se sacrificaron los ratones y se retiraron los pulmones, se fotografiaron (Figura 13A), se pesaron (Figura 13B) y se contaron las lesiones (Figura 13C). Figura 13A - Fotos digitales de los pulmones de los ratones inmediatamente después de cosecharlos. Figura 13B - El peso del tumor se calculó al sustraer el peso del pulmón de los ratones sin tratar del peso promedio del pulmón de los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados representan el promedio del peso del tumor $\pm$ SE de 7-8 ratones por grupo de tratamiento. Figura 13C - El número de lesiones de pulmón en ratones individual en los diversos grupos; las líneas negras representan las medianas del grupo; los pulmones con lesiones incontables se calificaron como 100. Se usó una prueba T por pares para calcular la significancia estadística entre los grupos * $P < 0.05$, ** $P < 0.025$.

El tratamiento con CM-24 en la presencia de TIL resultó en una robusta inhibición del crecimiento del tumor inhibición como puede apreciarse por la morfología del pulmón (Fig. 13A), los pesos de los tumores (Fig. 13B) y el número de las lesiones de pulmón (Fig. 13C), mientras que los ratones tratados con un control de IgG mostraron una carga de tumor masivo y muchas lesiones de melanoma de pulmón. Se observó una inhibición moderada del crecimiento del tumor (TGI 47%) sólo en el grupo que recibió linfocitos T reactivos humanos contra melanoma con un anticuerpo de control (TIL + IgG), pero cuando se agregó CM-24 se demostró una actividad anticáncer dependiente de la dosis y sustancial en todas las dosis examinadas (TGI de 84%, 87%, 90% y 93% en dosis de 1,3, 6 y 10 mg/kg respectivamente) con significancia estadística en las dosis de 6 y 10 mg/kg (Figura 13B). Los registros de foto digital de los pulmones en el día de término del ensayo (Figura 13A) mostraron una morfología del pulmón casi normal en los ratones tratados con CM-24 en la presencia de TIL,

indicando así que el CM-24 en la presencia de TIL elimina casi por completo a las células malignas.

En el grupo que recibió TIL y el control de IgG también se observó algún efecto anti-tumor, como se esperaba. Sin embargo, cuando se compara el efecto con los ratones tratados con CM-24 en términos de TGI, el número de lesiones de pulmón y morfología del pulmón, se observaron diferencias considerables.

La evaluación del número de lesiones de pulmón revelaron números muy bajos de lesiones de pulmón en todos los ratones tratados con TIL y las diversas dosis de CM-24 y ninguno de estos pulmones mostró más de 10 lesiones. Por el otro lado, en los grupos de IgG o TIL + IgG los animales mostraron un alto número de lesiones (>100) y las medianas de los grupos fueron considerablemente mayores que los ratones tratados con CM-24 (Figura 13C) (100 y 45 en los grupos de IgG y TIL + IgG en comparación a 5, 6, 3 y 2, en los grupos tratados con CM-24; $P < 0.025$).

Se observaron estos efectos a concentraciones tan bajas como 1mg/ml pero tuvieron significancia estadística en términos de peso de pulmón a concentraciones de CM-24 de 6 y 10 mg/kg.

Notas especiales: 1 ratón del grupo de IgG mostró morbilidad grave incluyendo parálisis de extremidades y fue sacrificado en el día 33 (se detectó carga de tumor masivo en el pulmón); 1 ratón del grupo TIL+ IgG mostró signos de morbilidad y murió en el día 49, el día del término del ensayo (se detectaron muchas lesiones); 1 ratón del grupo TIL+ CM-24 mostró morbilidad grave y reducción del peso corporal y se sacrificó en el día 39 (no se detectó evidencia de lesiones); 3 ratones del grupo de PBS mostró morbilidad grave durante el experimento y se sacrificaron en el día 42 y los otros dos ratones en el día 48 (se detectó carga de tumor masivo incluyendo alto número de lesiones en el pulmón en todos los ratones).

En el día de término, se usó un ensayo a base de citometría de flujo en combinación con un Kit QuantiBrite KIT para determinar la ocupación del receptor de CEACAM1 por CM-24 en TIL humano aislado de los pulmones de los ratones tratados. Los valores de ocupación del receptor (RO) en los ratones tratados con las diversas dosis de CM-24 demostraron (Figura 14) que el RO de 50% podría atribuirse a las concentraciones de 1 mg/kg (nivel de CM-24 en suero en el cuerpo) y se demostró >90% de RO en dosis de 3, 6 y 10 mg/kg (niveles de CM-24 en suero de 0.3, 48.5 y 111µg/ml, respectivamente). El examen de los valores de RO de CEACAM1 RO se realizó usando un ensayo basado en citometría de flujo usando anticuerpo de CM-24 conjugado a PE y un Kit QuantiBrite (BD). Los Resultados representan el promedio $\pm$ SE de los valores de RO en TIL aislado del pulmón de 8-9 ratones por grupo de tratamiento. Se analizaron los datos usando el software Kaluza.

De los datos anteriores es claro que se observó la inhibición sustancial del crecimiento del tumor en ratones tratados con CM-24 en la presencia de TIL, llevando a la

eliminación casi completa de las células malignas. Aunque todas las dosis de CM-24 demostraron respuestas anticáncer efectivas, las dosis incrementales mostraron correlación a mayores valores de inhibición del crecimiento del tumor (TGI de 84, 87, 90 y 93 correspondiente a las dosis de 1,3,6 y 10mg/kg respectivamente), que también tuvieron significancia estadística. Los resultados de RO *ex vivo* demuestran un RO >90% en dosis de 3, 6 y 10 mg/kg (niveles de CM-24 en suero 0.3, 48.5 y 111µg/ml respectivamente) mientras que se detectó RO de 50% en la dosis de 1mg/kg. Cuando se evalúan los datos de RO para ratones tratados con CM-24 a una dosis de 1mg/kg, aunque las concentraciones de CM-24 en suero son muy bajas, los datos de RO demuestran que el CM-24 aún está unido al TIL en los pulmones, implicando que el CM-24 puede mediar un efecto más duradero in vivo en el microentorno del tumor.

Estos resultados apoyan el modo de acción de CM-24 como un mejorador de la actividad citotóxica de las células efectoras contra las células malignas y muestran que el CM-24 es un potente agente anticáncer.

15

EJEMPLO 7

Resumen de los datos Pre-Clínicos

El CM-24 es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado anti-CEACAM1 humana que se une al dominio de N terminal de CEACAM1 y bloquea la interacción intercelular de CEACAM1 entre los linfocitos activados y las células de tumor; por lo tanto, se propone el bloqueo de las interacciones de CEACAM1 por CM-24 para mejorar la actividad asesina de los linfocitos y es una avenida prometedora para conseguir la inmunoterapia para el cáncer.

CM-24 muestra alta afinidad y unión selectiva a la CEACAM1 humana, que se expresa por los linfocitos activados o células de tumor. Los datos en los modelos inmunomoduladores *in vitro* demostraron que el CM-24 es un bloqueador potente de las interacciones intercelulares CEACAM1-CEACAM1 y puede mejorar la eliminación citotóxica de varias células de tumor positivas a CEACAM1 humana por NK positiva a CEACAM1 y células asesinas activadas por linfocina (LAK) y Linfocitos de Infiltración a Tumor (TIL). La mejor actividad asesina inducida por CM-24 puede ser mediada por la secreción de Granzima B e IFN γ como se demuestra en varios modelos.

El CM-24 mejora la actividad citotóxica de las células efectoras en la presencia de células de tumor positivas a CEACAM1 y en el contexto de una reacción de linfocitos T restringida por el antígeno de leucocito humano específico (HLA). El CM-24 no mejora la actividad citotóxica de linfocitos efectoras contra las células no objetivo positivas a CEACAM1 (células humanas normales). Además, los datos muestran que el CM-24 no tiene efectos agonísticos de tipo ligando, funciones

efectoras relacionadas a Fc o efectos directos. La unión de CM-24 a CEACAM1 no induce actividad agonística, y no puede observarse un efecto de CM-24 en las células efectoras en ausencia de células objetivo según se demuestra en los ensayos funcionales *in vitro*. Tampoco se espera que el CM-24 induzca citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) porque es un IgG4 es incapaz de unirse al componente complemento – C1q y el mediador de ADCC -Fcγ-RIIIa y no tiene un efecto directo en el índice de proliferación o viabilidad de células primarias positivas a CEACAM1 (linfocitos, células epiteliales y endoteliales).

Varios modelos de xenoinjerto de tumor *in vivo* demuestran que el CM-24 tiene una clara actividad anticáncer, que está acompañada por un aumento en la actividad inmunológica de linfocitos T dentro del tumor.

El bloqueo de CEACAM1 podría aliviar la inhibición mediada por CEACAM1 de los linfocitos infiltrantes de tumor positivos a CEACAM1 que encuentran células de cáncer positivas a CEACAM1 dentro del entorno del tumor. Se espera que el efecto inmunológico sea la mejora de la respuesta inmune local contra las células de tumor, lo que se espera resulte en su eliminación y posterior regresión clínica.

La evaluación preclínica de la seguridad del CM-24 incluyó la valoración del efecto de CM-24 en la proliferación de linfocitos T y secreción de citocina pro-inflamatoria. Se evaluaron las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) y la sangre entera de 10 donadores sanos se presentó el anticuerpo tanto por la forma soluble como inmovilizada. No hubo una proliferación aparente inducida por CM-24 y una secreción de citocina proinflamatoria nada significativa en los formatos de estímulo inmovilizado soluble o de revestimiento en seco.

Se realizó un estudio de dosis repetida de 6 semanas en macacos para evaluar la toxicidad y toxicocinética de CM-24. Se administró CM-24 a través de infusión intravenosa (IV) (la ruta de administración clínica destinada) una vez cada dos semanas por un total de 4 dosis (imitando el ciclo de tratamiento destinado en pacientes oncológicos) a dosis que representan 2.5X (25 mg/kg) y 10X (100 mg/kg) de la dosis máxima proyectada en humanos (10 mg/kg). No se observaron reacciones obvias adversas al tratamiento, ningún hallazgo patológico microscópico o grueso, y ninguna mortalidad. La oftalmoscopia y electrocardiografía no indicaron hallazgos relacionados al tratamiento. Además, se encontró que todas las pruebas de sangre y orina estuvieron dentro de los intervalos normales para macacos. En conjunto, el estudio toxicológico de dosis repetida GLP pivotal en macacos no mostró toxicidades relacionadas al tratamiento a cualquier nivel de dosis, y se determinó que el Nivel del Efecto No Observado (NOEL) es 100 mg/kg. La evaluación toxicocinética mostró un aumento proporcional a la dosis en la exposición a CM-24 (C_{máx}, AUC) cuando se administró por infusión IV. Un ligero aumento en C_{máx} y AUC en el día 42 en comparación al día 0

puede sugerir el potencial para alguna acumulación de CM-24 cuando el mAb se administra por esta ROA y régimen de dosificación a estos niveles de dosis. Un único animal en el grupo 2 (25 mg/kg) mostró una respuesta de anticuerpo anti-CM-24 positiva, sugiriendo que la respuesta ADA muy probablemente no tuvo efecto en ningún estudio de farmacocinética o toxicidad. Este resultado no
 5 representa una fuerte respuesta de inmunogenicidad a la dosificación repetida con los resultados de CM-24.

La dosis de inicio con seguridad clínica para CM-24 basada en el MABEL determinado de los experimentos in vivo en los resultados de los modelos de xenoinjerto de tumor de ratón está en el intervalo de 0.2-1 mg/kg, que comprende un factor de seguridad de 10 veces. El estudio de
 10 toxicología de dosis repetida GLP pivotal en macacos no mostró toxicidades relacionadas con el tratamiento a cualquier nivel de dosis, y se determinó que el Nivel del Efecto No Observado (NOEL) es 100 mg/kg (dosis humana equivalente (HED) de 100 mg/kg en una base de peso a peso), que claramente apoya el intervalo determinado por la evaluación MABEL. Los resultados de la proliferación de PBMC in vitro/*ex vivo* PBMC y ensayo de producción de citocina pro-inflamatoria no
 15 demostraron una inducción sustancial relacionada con CM-24 de proliferación de linfocitos T y producción de citocina pro-inflamatoria.

EJEMPLO 8

Un estudio de Escalación de Multi-dosis, de Multicentro, de Etiqueta Abierta, de Fase 1 20 de CM-24 en Sujetos con Malignidades Seleccionadas Avanzadas o Recurrentes

Seis tipos de tumor - melanoma, adenocarcinoma cáncer de pulmón de células no pequeñas, gástrico, colorrectal, de vejiga y cáncer de ovario - se seleccionaron para el estudio actual, ya que son representativos de tumores para los que existe una alta necesidad médica de
 25 nuevas terapias; para los que existe un precedente de respuestas clínicas a otras inmunoterapias; y para los que hay datos patológicos correlativos de soporte que sugieren que la trayectoria de la CEACAM1 es importante para la progresión del tumor.

El estudio incluye 2 fases: La Parte de Escalación y la Parte de Cohorte de Expansión. La Parte de Escalación de Dosis dura al menos 12 semanas comenzando con 4 infusiones
 30 (ciclo 1) para cada sujeto. Los sujetos sin Toxicidad Limitante de Dosis (DLT) y quienes mostraron evidencia de beneficio clínico (Respuesta Completa – CR, Respuesta Parcial – PR, Enfermedad Estable – SD) así como sujetos con Enfermedad Progresiva – PRD en la evaluación de imágenes quienes son de otro modo clínicamente estables son tratados por hasta un total de 5 ciclos adicionales (Periodo de tratamiento continuo) que dura hasta 38 semanas de tratamiento adicional y
 35 al menos 25 semanas de seguimiento (total 75 semanas/ aprox. 15 meses). La Parte de Expansión

dura hasta to 46 tratamiento semanas y al menos 25 semanas de seguimiento (total 71 semanas/aprox. 14 meses) en sujetos con melanoma cutáneo.

Objetivos Primarios:

- 5 1. Evaluar la seguridad y tolerancia de múltiples dosis escaladas de CM-24 (administrado intravenosamente) y
2. Determinar la dosis recomendada para la Fase 2 de CM-24, en sujetos con malignidades avanzadas o recurrentes incluyendo melanoma, adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas, y cáncer gástrico, colorrectal, de vejiga y de ovario.

10

Los Objetivos Secundarios incluyen:

1. Caracterizar el perfil farmacocinético de múltiple dosis de CM-24.
2. Caracterizar la inmunogenicidad de CM-24.
3. Evaluar la eficacia preliminar con base en la respuesta de tumor objetivo y
- 15 duración de respuesta en sujetos tratados con CM-24.

Los Objetivos de Exploración incluyen:

1. Explorar un biomarcador predictivo potencial asociado con la actividad clínica de CM-24 basado en los niveles de expresión de CEACAM1 en especímenes de tumor antes
- 20 del tratamiento.
2. Investigar la actividad inmuno-moduladora de CM-24 en poblaciones de células inmunes seleccionadas y factores solubles en tumores y sangre periférica.
3. Evaluar la supervivencia general en sujetos tratados con CM-24.

25 La Parte de Escalación de Dosis: Se programa la dosificación del fármaco de estudio por administrar en una manera escalonada iniciando con 0.01 mg/kg, y continuando a 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, y 10 mg/kg. Los sujetos se asignarán a un nivel de dosis en el orden de entrada al estudio. Para los primeros dos niveles de dosis (0.01mg/kg y 0.03mg/kg) 1 paciente en cada cohorte es enrolado en un diseño acelerado en el que una toxicidad relacionada al

30 fármaco única de grado 2 resulta en la expansión a un diseño de 3 + 3 a la dosis y todas las dosis posteriores. Para los sujetos en las dos cohortes menores (0.01mg/kg y 0.03mg/kg) la escalación de dosis de la primera cohorte de dosis única baja del paciente (0.01mg/kg) a la siguiente cohorte (0.03 mg/kg), y de la segunda cohorte de dosis única (0.03 mg/kg) a la siguiente cohorte (0.1 mg/kg) comenzar después de una ventana DLT de 6 semanas, si no ha ocurrido una toxicidad de Grado 2 o

35 mayor. Para los niveles de dosis de 0.1 mg/kg y superiores, al menos 3 pacientes por cohorte son

enrolados en un diseño estándar de 3 + 3 a menos que ocurra un DLT, en cuyo caso la cohorte es expandida a 6 pacientes. La escalación a la siguiente cohorte únicamente comienza después de una ventana de DLT de 8 semanas, comenzando de la administración del primer fármaco de estudio del primer sujeto de cada cohorte.

5 El Periodo de Dosificación incluye tres periodos: Investigación, Dosificación y Seguimiento: 1) 4 repetir la dosis que comprende el primer ciclo seguido por un periodo de observación de 6 semanas), 2) un Periodo de Tratamiento Continuo (2-6 ciclos) y 3), a Periodo de Seguimiento incluyendo la evaluación de la supervivencia general. Cada ciclo de tratamiento comprende 4 administraciones de dosis de fármaco de estudio cada 2 semanas. Al menos 3 sujetos
10 por cohorte son enrolados en un diseño estándar de 3 + 3. El número mínimo planeado de sujetos enrolados en esta parte es 17 pero puede aumentar si ocurren Toxicidades Limitantes de Dosis (DLTs). Si ocurren DLT a un nivel de dosis dado, este nivel de dosis se expande a 6 sujetos, entonces el número máximo de sujetos en la Parte de Escalación de Dosis es 42.

Los sujetos enrolados reciben 4 tratamientos, una vez cada 2 semanas (ciclo 1)
15 seguidos de una Ventana de Observación de 6 semanas; cuando es adecuado los sujetos entran al Periodo de Tratamiento Continuo durante el cual reciben ciclos adicionales (2-6). Durante este Periodo de Tratamiento Continuo, los sujetos se someten a evaluaciones clínicas y de laboratorio incluyendo examen físico (peso corporal, signos vitales y saturación de oxígeno), farmacocinética y farmacodinámica, recolección de citocina así como pruebas de laboratorio de seguridad y ensayos de
20 seguridad inmune y se registra un ECG. Todos los sujetos se someten a una evaluación de respuesta una semana y cinco semanas después del ciclo 1, basada en las evaluaciones de imágenes y clínicas. Una vez elegido para continuar en el estudio, se realizan evaluaciones de respuesta adicionales inmediatamente antes del comienzo del siguiente ciclo. Después del último ciclo de tratamiento continuado, se da seguimiento a los sujetos para seguridad, eficacia y supervivencia.

25 La Parte de Expansión: Se enrolan hasta 20 sujetos con melanoma cutáneo metastásico y se tratan a la dosis recomendada de Fase 2 (RP2D). Incluye 3 periodos: Investigación, Dosificación y Seguimiento. El Periodo de Dosificación consiste en 6 ciclos de 4 tratamientos cada uno administrado cada 2 semanas. El Periodo de Seguimiento incluye la evaluación de la
30 supervivencia general.

Los sujetos enrolados reciben la dosis recomendada de Fase 2 cada 2 semanas en cada ciclo. Se administran cuatro tratamientos y los sujetos continúan el tratamiento hasta 6 ciclos. Durante el Periodo de Dosificación, los sujetos se someten a evaluaciones clínicas y de laboratorio como se detalló antes.

35 Los sujetos deben tener un periodo de "depuración" de al menos 4 semanas antes

de la primera administración del fármaco de estudio de todos los agentes previos de quimioterapia y experimentales excepto por inmuno-moduladores (por ejemplo, pero sin limitación a: anticuerpos anti-CTLA4, anti-PD-L1, anti-PD-1, IL-2) que deben tener un periodo de "depuración" de al menos 6 semanas antes de la primera administración del fármaco de estudio, y todos los efectos adversos
5 hayan regresado ya sea al valor de referencia o estén estabilizados al Grado 1 o menos.

Los sujetos de melanoma con melanoma positivo a la mutación de B-Raf V600E o V600K deben haber progresado en, o eran intolerantes a, antes de la terapia de inhibidor de B-Raf-y/o de MEK.

10 Parte de Escalación de Dosis

El ciclo 1 consistirá de un Periodo de Repetición de Dosificación de 6 semanas (4 dosis, separadas cada 2 semanas); y un periodo de observación de 6 semanas.

Debe pasar al menos una 1 semana entre el primer tratamiento de cualquier sujeto en una cohorte de dosis y el primer tratamiento para el siguiente sujeto en esa cohorte de dosis.

15 Los sujetos son seguidos cercanamente durante el Periodo de Estudio Inicial de 12 semanas. Todos los sujetos se someten a evaluación de respuesta una semana y cinco semanas después del fin del ciclo 1 para evidencia y confirmación de beneficio clínico, definido como Enfermedad Estable (SD), Respuesta Parcial (PR) o Respuesta Completa (CR) para la semana 12. Los sujetos con evidencia de Enfermedad Progresiva (PRD) en cualquiera de la semana 7 u 11 con
20 imágenes después de ser reconsentidos en la Forma de Consentimiento Informado (ICF), pueden continuar la participación en el estudio y continuar el tratamiento de CM-24, si el investigador considera que se garantiza clínicamente según las Reglas de Salida del Estudio de la Sección de Deterioro Clínico y se evalúa posteriormente en la semana 15. Si las imágenes de seguimiento en la semana 15 confirman PRD, el sujeto no continúa el tratamiento debido a la progresión confirmada
25 de la enfermedad.

Todos los sujetos con DLTs, incluyendo el DLTs demorado, discontinuarán dosis adicionales con CM-24 pero no serán retirados del estudio.

Los sujetos que son retirados del estudio antes de terminar las primeras 3 administraciones del fármaco de estudio en el Periodo de Estudio Inicial (Ciclo 1) son reemplazados.

30 Los sujetos que son retirados por cualesquiera otras razones que el retiro de consentimiento reciben seguimiento durante las 4 visitas de seguimiento por un periodo de seis meses.

Los Ciclos 2-6 son denominados como el Periodo de Tratamiento Continuo. Después del Periodo de Estudio Inicial, los sujetos con evidencia de beneficio clínico, definido como SD, PR o CR según los criterios modificados de RECIST 1.1 y sin evidencia de Toxicidad Limitante de Dosis
35 (DLT) para la semana 12, pueden continuar el tratamiento con CM-24 al mismo nivel de la dosis

recibida durante el Periodo de Estudio Inicial por 5 ciclos de tratamiento adicional. Los sujetos con PRD que han sido confirmados pero que no han empeorado y de otro modo con estado clínico estable o mejorado deben continuar siendo tratados con el fármaco de estudio hasta que no haya progresión adicional o deterioro clínico.

5 Cada ciclo de tratamiento completo del Periodo de Tratamiento Continuo comprende 4 dosis de fármaco de estudio administrado cada 2 semanas, en los días 1, 15, 29, y 43. Una evaluación de respuesta se realiza entre los días 52 y 56 de cada ciclo de tratamiento. La evaluación de respuesta debe completarse antes de administrar la primera dosis del siguiente ciclo.

10 Durante el Periodo de Tratamiento Continuo, los sujetos con PRD que han sido confirmados pero que no han empeorado y de otro modo con estado clínico estable o mejorado deben continuar siendo tratados con el fármaco de estudio hasta que no haya progresión adicional o deterioro clínico.

Después de la última administración de CM-24 en el Periodo de Tratamiento Continuo, cada sujeto es seguido durante 4 visitas de seguimiento por un periodo de seis meses.

15 Todos los sujetos con DLTs, incluyendo el DLTs demorado, discontinuarán dosis adicionales con CM-24 pero no serán retirados del estudio.

A todos los sujetos se les da seguimiento indefinidamente para supervivencia.

Expansión de Cohorte

20 Para los primeros dos niveles de dosis (0.01 mg/kg y 0.03 mg/kg) 1 paciente en cada cohorte es enrolado en un diseño acelerado en el que una toxicidad relacionada al fármaco única de grado 2 resulta en la expansión a un diseño de 3 + 3 a la dosis y todas las dosis posteriores. Para los sujetos en las dos cohortes menores (0.01 mg/kg y 0.03 mg/kg) la escalación de dosis de la primera cohorte de dosis única baja del paciente (0.01 mg/kg) a la siguiente cohorte (0.03 mg/kg), y de la segunda cohorte de dosis única (0.03 mg/kg) a la siguiente cohorte (0.1 mg/kg) comenzar después de una ventana DLT de 6 semanas, si no ha ocurrido una toxicidad de Grado 2 o mayor. Para los niveles de dosis de 0.1 mg/kg y superiores, al menos 3 pacientes por cohorte son enrolados en un diseño estándar de 3 + 3 a menos que ocurra un DLT, en cuyo caso la cohorte es expandida a 6 pacientes. La escalación a la siguiente cohorte únicamente comienza
25 después de una ventana de DLT de 8 semanas, comenzando de la administración del primer fármaco de estudio del primer sujeto de cada cohorte.
30

Si ningún sujeto adicional en la cohorte de 6 sujetos tiene un DLT, entonces después de la revisión siguiente de los datos de seguridad para todos los sujetos por el Comité de Seguridad, puede proceder la escalación de la dosis.

35 Si 2 o más sujetos en una cohorte de dosis de 3- o 6 sujetos desarrollan DLTs, se

detiene la escalación de la dosis, y:

Si la cohorte del nivel de dosis anterior no se ha expandido aún a 6 sujetos, será expandida a 6 sujetos.

Si la cohorte de nivel de dosis anterior ya fue expandida a 6 sujetos, el Comité de Seguridad, después de la revisión de todos los datos de seguridad a la fecha, puede:

Considerar que el nivel de dosis (anterior) es la dosis recomendada de la Fase 2 (RP2D), o

Recomienda la evaluación de una nueva cohorte a una dosis intermedia.

La dosis recomendada de Fase 2 (RP2D) se define como el nivel de dosis más alto en el que no más de 1 de 6 sujetos experimenta un DLT.

Escalación de Dosis

Si no se encuentran DLTs en la ventana de DLT de 6 semanas para las cohortes de la dosis más baja, y para el resto de cohortes, una ventana de DLT de 8 semanas, luego la siguiente cohorte comienza y se repite el mismo patrón. Hay un periodo de espera de una semana entre los enrolamientos de sujetos dentro de cada cohorte de nivel de dosis. Antes de la escalación de la dosis los datos de seguridad disponibles para todos los sujetos tratados en el estudio a la fecha, incluyendo la cohorte actual, se evalúan por el Comité de Seguridad.

La dosificación (ciclo 1) de la siguiente cohorte de dosis inicia únicamente después de que se ha completado la repetición de la dosificación (ciclo 1) para todos los sujetos en la cohorte de dosis anterior. La programación de la revisión del Comité de Seguridad se basa en los datos que sugieren que el irAEs en los pacientes tratados con otros inmuno-moduladores ocurre dentro de las 5-10 semanas después de la administración. Si ocurre un DLT, necesitando la expansión de la cohorte de dosis de tratamiento a seis sujetos, la ventana de DLT se expande para abarcar la completa repetición de la dosificación (ciclo 1) de todos los seis sujetos.

Si, después de que se escala la dosis, si 2 o más DLT demorados se encuentran a una dosis más baja, y que pueda ser posible un AE de DLT relacionado con CM-24, se suspende temporalmente la acumulación y se notifica al Comité de Seguridad dentro de 24 horas. El Comité de Seguridad evaluará rápidamente el evento y la información relevante, incluyendo datos PK, y hace cualquier ajuste necesario en la dosis y/o el esquema de escalación de dosis. Se tomarán los mismos pasos si ocurren 2 o más DLTs demorados en una cohorte expandida de 6 sujetos examinado-anteriormente.

Los DLT demorados serán revisados por el Comité de Seguridad siguiendo los lineamientos y las decisiones se hacen en una base de caso por caso. Esas acciones pueden incluir aplicar las reglas estándar de escalación de DLT, regresando a una dosis más baja o intermedia, o

no tomando una acción si el evento relacionado con la dosis que se examina no es suficientemente serio para alterar la escalación de dosis y la dosificación actual no se considera un riesgo para los sujetos.

5 Parte de Expansión

La Parte de Expansión de este estudio permite enrolar hasta 20 sujetos con melanoma cutáneo avanzado. Pueden abrirse otros brazos de expansión de hasta 20 sujetos, sometido a la enmienda del protocolo, en las indicaciones estudiadas previamente durante la Parte de Escalación de Dosis del ensayo, si las señales de eficacia temprana lo garantizan. Los sujetos
10 enrolados son tratados a RP2D por hasta seis ciclos, con el tratamiento administrado en los días 1, 15, 29, y 43. Se realiza una evaluación de respuesta entre los días 52 y 56. La evaluación de respuesta debe completarse antes de la primera administración de la dosis en el siguiente ciclo.

El enrolamiento puede mantenerse en la Parte de Expansión si el índice de DLTs es $\geq 33\%$. Los sujetos que toleran el fármaco de estudio no son excluidos automáticamente de la
15 dosificación continua hasta la revisión del Comité de Seguridad, y se les deja continuar la dosificación en tanto que sea tolerada a menos que sea indicado lo contrario como resultado de la revisión de seguridad. Después del análisis de seguridad, se toma una decisión de si finalizar el enrolamiento y continuar con la dosificación a la dosis actual o continuar el enrolamiento de más sujetos a una dosis más baja. Para los DLTs, el enrolamiento se mantiene y/o reinicia después de la
20 revisión del Comité de Seguridad.

Lineamientos de la Decisión de Tratamiento

Se evalúa la respuesta del tumor usando los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST 1.1). El final del ciclo de evaluaciones de respuesta de tumor para todos
25 los sujetos ocurre dentro de los días 52 a 56 de cada ciclo de tratamiento (los resultados de las evaluaciones deben ser revisados y documentados antes de la primera dosis del siguiente ciclo). Después de cada ciclo de tratamiento (continuo o de expansión), la decisión de tratar un sujeto con un ciclo adicional de CM-24 se basa en la evaluación del tumor, a menos que el sujeto desarrolle un evento adverso $\geq$ Grado 3 (CTCAE) u otros eventos adversos relacionados al CM-24 que excluya un
30 tratamiento adicional. Los sujetos son tratados hasta que se confirma la Respuesta Completa (CR) o Enfermedad Progresiva (PRD) una vez ambos confirmados y entonces progresa después como se describe en lo siguiente. Los sujetos con PRD que han sido confirmados pero que no han empeorado y de otro modo con estado clínico estable o mejorado (es decir, sin reducción en el estado del desarrollo del ECOG) deben continuar siendo tratados con el fármaco de estudio hasta que haya más
35 progresión o deterioro clínico, como se elabora más adelante.

Los sujetos con una Mejor Respuesta General (BOR) de CR, PR o SD continúan recibiendo el tratamiento de CM-24 hasta la primera ocurrencia de cualquiera de:

Logro de un CR confirmado;

5 Deterioro clínico que sugiere que es probable que no haya un beneficio adicional del tratamiento;

Cumple los criterios de la discontinuación de la terapia de estudio (DLT) u otra intolerancia a la terapia; o

Recibe el número máximo de ciclos.

10 Periodo de Seguimiento

Se da seguimiento a los sujetos por un periodo de al menos seis meses comenzando de la última infusión de tratamiento. La 1° visita de seguimiento se realizará dentro de 7 días del último escaneo de formación de imágenes. Las visitas de seguimiento 2-4 se realizarán a intervalos de 56 días. Además, se evalúa el estado de supervivencia aproximadamente cada 3 meses, indefinidamente, ya sea por contacto telefónico o personal, después del término o discontinuación del tratamiento, y seguimiento del estudio. Las fechas de muerte se reportan para cualquier sujeto que haya fallecido. Las evaluaciones de supervivencia general se hacen hasta el término del estudio o por el término por el Patrocinador. No se recolectan otros datos (por ejemplo, terapias posteriores, estado de desempeño etc.) diferentes a la supervivencia durante estas llamadas o visitas.

20 Cuando un sujeto discontinúa el tratamiento con el fármaco de estudio, debe documentarse la fecha y la razón para discontinuar el fármaco de estudio en los documentos fuente, y el sujeto debe ingresar al Periodo de Seguimiento. Cuando un sujeto se retira del estudio (durante el Periodo de Tratamiento o de Seguimiento), deben hacerse todos los esfuerzos para asegurarse que se realizan todas las evaluaciones asociadas con esa visita de estudio y se documenta la fecha y razón para discontinuar en los documentos fuente.

Después del término de los periodos de tratamiento y seguimiento, todos los sujetos supervivientes reciben seguimiento del estado de supervivencia cada 3 meses, indefinidamente.

30 Descripción Física del fármaco de estudio

El CM-24 se suministra en un frasco de 10mL de un solo uso. Cada frasco contiene una solución concentrada con el equivalente de 100mg de CM-24 (10 mg/mL).

El CM-24 es administrado como una infusión intravenosa, con un filtro en línea de 0.2 micras a las dosis especificadas en el protocolo.

Instrucciones para la preparación de las diferentes dosis:

Para sujetos que reciben dosis de 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg y 1.0 mg/kg, se usa una bolsa IV de 50 mL de cloruro de sodio al 0.9% para la preparación. La infusión debe proceder a una velocidad de 1.0 mL/minuto. Debe realizarse el redondeo durante la preparación de la dosis sólo cuando sea absolutamente necesario y debe realizarse en una manera que permitirá que se mantenga una concentración mínima de 0.25 mg/mL.

Para los sujetos que reciben dosis de 3 mg/kg, se usa una bolsa IV de 100 mL de cloruro de sodio al 0.9% para la preparación. La infusión debe proceder a una velocidad de 2.0 mL/minuto. Debe realizarse el redondeo durante la preparación de la dosis únicamente cuando sea absolutamente necesario.

Para los sujetos que reciben dosis de 10 mg/kg, se usa una bolsa IV de 250 mL de cloruro de sodio al 0.9% para la preparación. La infusión debe proceder a una velocidad de 3.0 mL/minuto. Debe realizarse el redondeo durante la preparación de la dosis únicamente cuando sea absolutamente necesario.

Marcadores Farmacodinámicos (PD)

Se toman muestras de sangre y se examinan por ensayos inmunes y otras evaluaciones en los siguientes de tiempo: pre-dosis de 1ª administración del fármaco de estudio, 48 horas después de la 1ª y 4ª dosis del Ciclo 1 de administración del fármaco de estudio, y pre-dosis de 4ª (última) dosis de cada ciclo completo (ciclos 2-6 de escalación de dosis, y todos los ciclos de la cohorte de expansión), visitas de seguimiento 2-4, e incluye:

- subtipos de linfocito (CD4, CD8 y CD56) en combinación con marcadores de activación (CD69, CD107a y HLA-DR), linfocitos T reguladores por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)
- expresión de CEACAM1 en subtipos de linfocitos
- CEACAM1 y Granzima B solubles en suero
- por ciento de ocupación de receptor de CEACAM1 por CM-24
- células supresoras derivadas mieloides (MDSCs) (CD14+, HLADR bajo, CD11b+)
- proteínas de punto de verificación inmune, por ejemplo PD-1, TIM-3, LAG, Vista

Farmacocinética (PK)

La farmacocinética se estudia inicialmente durante la Parte de Escalación de Dosis durante la primera infusión (primera dosis del Ciclo 1) y durante las cuartas infusiones (última dosis

del Ciclo 1). Los niveles pre-dosis también se toman antes de cada tratamiento en el 1º ciclo. Pueden examinarse sujetos de Expansión de Dosis adicional (hasta 6) para la evaluación PK en el RP2D preliminar si parece garantizarse una caracterización PK más robusta de CM-24.

El perfil PK de CM-24 se evalúa en plasma hasta 15 días post dosis para la primera
5 dosis y 36 días post-infusión para la cuarta dosis. Los siguientes parámetros PK se derivan de los perfiles de concentración en plasma contra el tiempo: $C_{máx}$, $t_{1/2}$, $T_{máx}$, AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$.

Las muestras se tomarán a la primera y la cuarta infusiones en los siguientes puntos de tiempo: pre-infusión (valor de referencia); al final de la infusión y a 1, 4, 8, 24 horas post-infusión. Para la 1ª y 4ª dosis únicamente: en los días 3, 5, 8, 15 (o pre-dosis del siguiente
10 tratamiento) y para la 4ª dosis también en los días 22 y 36 post-infusión. Los niveles de pre-dosis se tomarán antes de cada tratamiento en el 1º ciclo. Referirse al Programa de Eventos y al Manual de Laboratorio para información adicional sobre la recolección de muestras y envío de muestras.

Biopsias de Tumor Fresco

15 Muestras de tumor se evaluaron para lo siguiente: CD4, CD8, CD56, FOXP3, CEACAM1, Granzima B, CM-24, % de ocupación del receptor de CEACAM1 por CM-24.

Parte de Escalación de Dosis: Se pidió a los sujetos proporcionar una muestra de tejido de biopsia fresco opcional (o archivado si fue tomado en los pasados seis meses) al valor de referencia y una semana después del segundo tratamiento del 1º ciclo.

20 Parte de Expansión: Se toman dos muestras de tumor fresco, en la Investigación y una semana después de la 2ª administración de la dosis del 1º ciclo. Además, se motivó a los sujetos pero no se requirió proporcionar una biopsia adicional una semana después de los cuartos tratamientos del 1º ciclo.

Puntos finales de Eficacia

25 Los siguientes puntos finales se usan para evaluar la eficacia preliminar, y se derivan de los criterios modificados de RECIST 1.1:

- Índice de Respuesta Objetiva (ORR)
- Duración de la Respuesta (DOR)
- 30 • Estado de la Respuesta del tumor
- Índice de Control de Enfermedad (DCR)
- Respuesta Durable (DR)
- Mejor Respuesta General (BOR) - Respuesta Completa (CR), Respuesta parcial (PR), Enfermedad Estable (SD) y Enfermedad Progresiva (PRD)
- 35 • Supervivencia Libre de Progresión (PFS)

- Tiempo para Respuesta (TTR)
- Supervivencia General (OS)
- Por ciento de Cambio en la Carga de Tumor (PCTB), evaluado por CT o MRI

El punto final de eficacia antes listado será evaluado en:

5 Cohortes de Escalación de Dosis:

- Semana 7, una semana después de la administración de la cuarta dosis del primer ciclo.
- Semana 11, cinco semanas después de la administración de la cuarta dosis del primer ciclo

10 • Semana 18-19, semana 26-27, semana 34-35, semana 42-43, semana 48-49 y semana 50-51, después de los cinco ciclos adicionales, más 2-4 visitas de seguimiento.

Cohorte de Expansión de Dosis:

- Semana 7-8, semana 14-15, semana 22-23, semana 30-31, semana 38-39, semana 46-47, más 2-4 visitas de seguimiento 2-4.

15

Puntos finales de Eficacia Inmuno-Relacionados

Evaluaciones adicionales exploradores de eficacia pueden incluir la aplicación de criterios de respuesta inmuno-relacionado (irRC) basados en modificaciones al RECIST 1.1 (denominado como irRECIST) e incluyen los siguientes puntos finales.

- 20 • Respuesta general mejor inmuno-relacionada (irBOR) con las categorías de respuesta irCR, irPR, irSD, irPD;
- Índice de respuesta objetiva Inmuno-relacionada (irORR) durante todo el periodo del estudio;
- Duración de las respuestas ir (DOirR) para esos sujetos con respuestas ir;
- 25 • El irORR basado en los resultados de irBOR en cualquier número de ciclos puede también ser derivado.

Puntos finales Farmacocinéticos (PK)

30 La farmacocinética se estudia durante la Parte de Escalación de Dosis durante los siguientes puntos de tiempo PK: Las muestras se tomarán a la primera, y la cuarta infusiones en los siguientes puntos de tiempo: pre-infusión (valor de referencia); al final de la infusión y a 1, 4, 8, 24 horas post-infusión. Para la 1ª y 4ª dosis: en los días 3, 5, 8, 15 (pre-dosis del siguiente tratamiento) y para la 4ª dosis también en los días 22 y 36 post-infusión. Los niveles pre-dosis se toman antes de cada tratamiento en el 1^{er} ciclo.

35 Pueden examinarse sujetos de Expansión de Dosis adicional (hasta 6) para la

evaluación PK en el RP2D preliminar si parece garantizarse una caracterización PK más robusta de CM-24.

EJEMPLO 7

Formulación

Una formulación ejemplar de un mAb humanizado según la presente invención comprende lo siguiente:

Concentración (mg/ml)	Ingrediente
10.00	Sustancia de fármaco CM-24
4.65	L-Histidina
82.00	Sacarosa
0.20	Polisorbato 20