



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 556**

51 Int. Cl.:
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06841605 .6**
96 Fecha de presentación : **22.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2004696**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Moléculas de anticuerpo específicas de la proteína de activación de fibroblastos e inmunoconjugados que las contienen.**

30 Prioridad: **05.01.2006 EP 06100121**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2010

73 Titular/es:
Boehringer Ingelheim International GmbH
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

72 Inventor/es: **Ostermann, Elinborg;**
Heider, Karl-Heinz;
Kalat, Milena y
Adolf, Guenther

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 348 556 T3

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

MOLÉCULAS DE ANTICUERPO ESPECÍFICAS DE LA PROTEÍNA DE
ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS E INMUNOCONJUGADOS QUE LAS
5 CONTIENEN

Descripción

La invención se refiere a nuevas moléculas de anticuerpos anti-FAP- α y a inmunoconjugados citotóxicos que contienen dicho anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, un maitansinoide, a compuestos farmacéuticos que comprenden dichos inmunoconjugados y a su utilización en la terapia de tumores.

Se han producido numerosos intentos de mejorar la eficacia de los medicamentos antineoplásicos por conjugación de dichos medicamentos con anticuerpos contra antígenos asociados a tumores, a efectos de aumentar la concentración local del medicamento por administración direccionada hacia el tumor. Muchos de estos intentos han tenido un éxito limitado y se han discutido algunas de las razones en la literatura para explicar el fallo. Para medicamentos anticáncer que actúan de forma estequiométrica, tales como por ejemplo la doxorubicina o metotrexato, son necesarias concentraciones intracelulares relativamente altas para ejercer la citotoxicidad requerida. Estas concentraciones se cree que son difíciles de conseguir con muchos conjugados anticuerpo-medicamento a causa de (a) insuficiente efectividad de muchos medicamentos anticáncer habituales, (b) baja concentración en la superficie celular de las dianas antígeno, (c) internalización poco eficaz de los complejos antígeno-anticuerpo en la célula diana y (d) liberación poco eficaz del medicamento libre con respecto al conjugado dentro de la célula objetivo o diana (Chari y otros, 1992).

Dos de los inconvenientes antes mencionados, es decir, (a) y (d) fueron objeto del trabajo de Chari y colaboradores (Chari y otros, 1992; Liu y otros, 1996; patente US 5.208.020). Estos autores desarrollaron conjugados de anticuerpos en los que el anticuerpo está ligado a un maitansinoide con intermedio de un enlace de bisulfuro. Las maitansinas pertenecen a la clase de antibióticos macrólidos Ansa que derivan de *Nocardia sp.*. La maitansina ansamitocina P-3, producida por fermentación bacteriana, es utilizada como molécula precursora para la fabricación de maitansinoide DM1. La maitansina y derivados actúan como agentes antimitóticos (inhibidores de la polimerización de la tubulina) similar a la vincristina, pero con una efectividad notablemente más elevada que la vincristina u otros agentes quimioterapéuticos conocidos (DM1 es tóxico con respecto a células in vitro a una concentración de $\sim 10^{-10}$ M). En contraste con la elevada citotoxicidad del maitansinoide libre, el conjugado del anticuerpo tiene una toxicidad que es varios órdenes de magnitud inferior en células antígeno-negativas en comparación con células antígeno-positivas. El enlace por unión de bisulfuro tiene la ventaja de que estos enlaces son fraccionados fácilmente dentro de las células objetivo por glutatión intracelular, liberando el medicamento libre altamente tóxico. Este enfoque ha sido aplicado a anticuerpos contra antígenos asociados a tumor, por ejemplo, el conjugado C242-DM1 (Liu y otros, 1996; Lambert y otros, 1998) y HuN901-DM1 (Chari y otros, 2000). No obstante, la aplicación de estos conjugados está restringida debido a la expresión limitada de los respectivos antígenos diana. Por ejemplo, el antígeno reconocido por N901 (CD56, N-CAM) es expresado predominantemente por tumores de origen neuroendocrino, la expresión del antígeno C242 (CanAg) está limitada principalmente a tumores derivados del tracto GI.

Para mejorar este enfoque aplicándolo a antígenos apropiados asociados a tumor con modelo de expresión de antígeno favorable, elevada y específica concentración de antígeno en la superficie de la célula dentro de los tejidos objetivo y un eficaz proceso de internalización que transporta el conjugado antígeno de complejo-anticuerpo a las células, se desarrollaron inmunoconjugados anti-CD44-anticuerpo-DM1 (WO 02/094325).

No obstante, existe todavía la necesidad de agentes inmunoterapéuticos innovativos que tengan un efecto inhibitorio en antígenos diana asociados a tumores que tienen baja expresión en tejidos normales y elevada expresión en gran variedad de tumores.

Los análisis inmunohistoquímicos han demostrado que la Proteína de Activación de Fibroblastos (a continuación designada también "FAP") muestra una distribución restringida en tejidos normales. Entre tejidos lesionados de adultos no neoplásicos, la expresión del FAP ha sido observada en los fibroblastos activados de la curación de heridas, en artritis reumatoide y en células estrelladas hepáticas activadas durante la cirrosis, mientras que en tejidos adultos normales solamente son positivos a FAP las células isleta (A) pancreáticas. En contraste, se observan fibroblastos estromales positivos a FAP en el estroma de más de 90% de tumores malignos de pecho, ovarios, colorrectales, pulmón, piel, próstata y pancreáticos. Una determinada proporción de células tumorales de sarcoma de huesos y tejidos blandos es también FAP positiva (Rettig y otros, 1998). Debido a su amplia expresión en muchos cánceres y su modelo de expresión restringido en tejidos normales, la proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP- α ; a continuación designada FAP) se ha considerado que es un objetivo antigénico

atractivo, no obstante, las inmunoterapias basadas en el direccionado del antígeno FAP no han tenido éxito.

El crecimiento invasivo de cánceres epiteliales está asociado a una serie de cambios celulares y moleculares en el estroma de soporte. Un rasgo molecular muy continuado estromal reactivo de muchos tipos de cáncer epitelial es la inducción de FAP, una molécula de la superficie celular de fibroblastos estromales reactivos (Garin-Chesa y otros, 1990). Dado que el antígeno FAP es expresado selectivamente en el estroma de una serie de carcinomas epiteliales, independientes de la localización y tipo histológico, el concepto de estroma diana por direccionado de FAP ha sido desarrollado para la formación de imágenes, diagnóstico y tratamiento de cánceres epiteliales y algunos otros estados. Con este objetivo, un anticuerpo monoclonal designado F19 (segregado por la línea celular de hibridoma con acceso ATCC n°HB 8269), que se une específicamente a FAP fue desarrollado y descrito en las patentes US 5.059.523 y WO 93/05804. Para mejorar adicionalmente este concepto, el anticuerpo F19 fue humanizado; el anticuerpo conseguido que se une específicamente a FAP se describe en el documento WO 99/57151 (ver más adelante).

Si bien la acumulación selectiva de un anti-FAP MAb murino en tejidos estromales tumoral fue demostrado con MAb F19 monoclonal murino marcado con trazas (^{131}I -radiomarcado) en estudios de formación de imágenes de biodistribución (Welt y otros, 1994; Tanswell y otros, 2001), el concepto de inhibición de tumor por direccionado al estroma no ha sido satisfactorio en la terapia del cáncer. Si bien una fase I de MAb sibrotuzumab (BIBH1) anti-FAP ^{131}I -radiomarcado demostró que la administración de repetidas infusiones de sibrotuzumab es segura y bien tolerada (Scott y otros, 2001; Hofheinz y otros, 2003), en un estudio de fase II con sibrotuzumab no marcado que fue llevada a cabo en pacientes con cáncer

colorrectal metastático avanzado se observó en la mayor parte de pacientes el progreso continuado del tumor. Por lo tanto, dado que no se cumplieron las exigencias mínimas, este estudio fue interrumpido.

5 Era un objetivo de la invención el dar a conocer agentes inmunoterapéuticos mejorados basados en anticuerpos anti-FAP que se dirigían a las células tumorales malignas expresando el antígeno FAP. Otro objetivo de la invención era el de dar a conocer inmunoterapéuticos mejorados basados en anticuerpos
10 anti-FAP. Estos inmunoterapéuticos deben direccionarse a células estromales no malignas expresando FAP en tumores, de manera que las células malignas no expresan FAP, pero a pesar de ello son exterminadas eficazmente por el medicamento inmunoterapéutico.

15 Para solucionar el problema que subyace en la invención era un requisito previo proporcionar en primer lugar modelos animales apropiados para la prueba del concepto. La factibilidad de experimentos en animales, que son cruciales para demostrar el concepto de direccionado de células
20 estromales y como consecuencia exterminar células tumorales de manera directa o indirecta, se basa en la disponibilidad de un anticuerpo anti-FAP que reacciona con FAP tanto humano como de ratón. Dicha reactividad cruzada es una exigencia para llevar a cabo estudios en modelos de cáncer basados en
25 xenoinjertos de tumor humano, desarrollándose en ratones inmunodeficientes, porque en estos modelos, si bien la células tumorales son de origen humano, las células estromales son derivadas del ratón. Los resultados de los experimentos de la presente invención han demostrado que los
30 anticuerpos anti-FAP conjugados a un maitansinoide altamente citotóxico exterminan tumores de manera muy eficaz in vivo. De los resultados de los experimentos, los inventores han llegado a la conclusión que el exterminio del tumor puede ser provocado, por una parte, por el direccionado del FAP a las

células estromales, debido a su característica de ser antígeno estromal. Por otra parte, se ha podido demostrar que los conjugados maitansinoides de anticuerpos anti-FAP son altamente eficaces en el exterminio de células tumorales en xenoinjertos de tumor humano expresando FAP, un efecto que
5 podría ser atribuido, en el ámbito experimental escogido, a la propiedad de FAP de ser antígeno del tumor.

La presente invención se refiere a nuevas moléculas de anticuerpo y anti-FAP y a inmunoconjugados que consisten en
10 cualquiera de dichas moléculas de anticuerpos específicas de FAP conjugadas a maitansinoides.

En un primer aspecto, la presente invención da a conocer una molécula de anticuerpo anti-FAP- α seleccionada entre

- a. un anticuerpo monoclonal murino definido por
 - 15 i. una cadena pesada variable que comprende la región de aa 20 a 136 de la secuencia (SEQ ID NO:1);
 - ii. una cadena ligera variable comprendiendo la región de aa 23 a 129 de la secuencia (SEQ ID NO:2) y
 - iii. la subclase IgG2a kappa;
- 20 o bien un fragmento o derivado del mismo;
- b. un anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo monoclonal murino definido en a);
- c. un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal murino definido en a); o un fragmento o derivado
25 del mismo.

El anticuerpo monoclonal murino definido en a) ha sido designado "MFP5".

A continuación, las moléculas de anticuerpo anti-FAP, definidas en lo anterior, objeto de la invención se designan
30 "anticuerpos MFP5" o bien "moléculas de anticuerpo MFP5".

Se ha descubierto que el anticuerpo MFP5 reacciona tanto con FAP murino como humano. Eso proporciona una característica muy ventajosa de las moléculas de anticuerpo

MFP5 de que tienen también esta propiedad, en que dichas moléculas de anticuerpo MFP5 pueden ser utilizadas para estudiar el impacto del direccionado estromal, lo que es importante para la eficacia terapéutica de los
5 inmuconjugados de la invención. Dado que el estroma del tumor en los modelos de xenoinjertos de ratón es de origen murino, esta característica de reactividad cruzada es indispensable para llevar a cabo estudios en animales.

En una realización de la invención, el anticuerpo
10 quimérico b) se define por

- i. una cadena pesada variable que comprende la región de aa 20 a 136 de la secuencia (SEQ ID NO:1);
- ii. una cadena ligera variable comprendiendo la región de aa 23 a 129 de la secuencia (SEQ ID NO:2) y
- 15 iii. cadenas constantes pesadas y ligeras que son de origen humano.

La construcción y producción de anticuerpos quiméricos ratón/humanos, que representan la "primera generación" de anticuerpos humanizados, es bien conocida en esta técnica
20 (Boulianne y otros, 1984). Las zonas variables del anticuerpo no humano están relacionadas de manera típica como mínimo a una parte de la región de inmunoglobulina constante (F_c) de una inmunoglobulina humana. Se pueden aislar secuencias de ADN de región constante humana de acuerdo con procedimientos
25 bien conocidos a partir de una serie de células humanas, preferentemente de células inmortalizadas B (ver Kabat y otros, 1991; *supra*, y WO 87/02671). Las moléculas de anticuerpo pueden contener la totalidad o solamente una parte de la región constante, siempre que muestren unión específica
30 al antígeno de FAP. La elección del tipo longitud de la región constante depende de si se desean funciones efectoras, tales como fijación complementaria o toxicidad celular dependiente del anticuerpo y de las propiedades farmacológicas deseadas de la proteína del anticuerpo. La

molécula del anticuerpo será de manera típica un tetrámero consistente en dos pares de cadenas ligeras/cadenas pesadas, pero también puede ser un dímero, es decir, consistente en un par de cadenas ligeras/pesadas, por ejemplo un fragmento Fab
5 ó Fv.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico FAP-específico (designado cMFP5) que tiene la región variable de cadena pesada de MFP5 fusionada a la región constante de cadena pesada humana (IgG1) (SEQ ID NO:3)
10 y la región variable de cadena ligera de MFP5 fusionada a la región constante de cadena ligera humana (kappa) (SEQ ID NO:4). En los experimentos de la presente invención, este anticuerpo fue expresado en células de mamífero y utilizado para marcado inmunohistoquímico de células estromales en
15 xenoinjertos de tumor humano desarrollados en ratones inmunodeficientes.

Otras regiones humanas constantes para quimerizar MFP5 se encuentran a disposición para los técnicos en la materia, por ejemplo IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE ó IgM y regiones
20 constantes de cadena ligera kappa o lambda.

En una realización de la invención, el anticuerpo humanizado c) se define por

i. las CDR contenidas dentro de la cadena pesada variable que comprende la región de aa 20 a 136 de la
25 secuencia (SEQ ID NO:1) y por

ii. las CDR contenidas dentro de la cadena ligera variable comprendiendo la región de aa 23 a 129 de la secuencia (SEQ ID NO:2)

iii. armazones que soportan dichos CDR que proceden
30 de un anticuerpo humano,

iv. cadenas constantes pesada y ligera que proceden de un anticuerpo humano.

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de

inmunoglobulina o fragmentos de la misma (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados
5 incluyen inmunoglobulinas humanas (procedentes del anticuerpo receptor) en la que residuos de una región determinante complementaria (CDR del anticuerpo receptor son substituidas por residuos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo cedente), tal como un ratón, rata o conejo, que
10 tiene la especificidad deseada, afinidad y capacidad. En algunos casos, los residuos de armazón Fv de la inmunoglobulina humana son substituidos por correspondientes residuos no humanos.

En el anticuerpo humanizado definido en c), las regiones
15 que determinan la complementariedad (CDRs) de MFP5 se han injertado en los genes respectivos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana.

Las "regiones determinantes de complementariedad" (CDRs) de un anticuerpo monoclonal se comprende que son las
20 secuencias de aminoácidos involucradas en unión de antígenos específica, de acuerdo con Kabat y otros (1991) en relación con Chothia y Lesk (1987). De las secuencias de las regiones variables contenidas en SEQ ID NO: y SEQ ID NO:2, la secuencia CDR puede ser determinada rutinariamente por
25 búsqueda de la base de datos de la secuencia Kabat para características de la secuencia.

Los residuos apropiados de armazón de anticuerpo injertado CDR pueden ser revertidos a residuos murinos para asegurar la afinidad de unión. Tal como se ha descrito en lo
30 anterior, a partir de métodos pertinentes a esta técnica, los expertos conocen la forma de obtener las CDR de MFP5 para escoger y obtener genes de inmunoglobulina humana apropiados, injertar la CDR en estos genes, modificar residuos seleccionados del armazón, expresar el anticuerpo injertado

CDR en células madre apropiadas, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) y probar los anticuerpos recombinantes resultantes en cuanto a afinidad de unión y especificidad (ver, por ejemplo, las referencias de literatura antes indicadas).

Para obtener un anticuerpo humanizado, los sitios de unión del antígeno, que son formados por las CDR de la cadena pesada y las CDR de la cadena ligera son extraídas del ADN de células que segregan el anticuerpo monoclonal del roedor (murino) e injertadas en el ADN que codifica para el armazón del anticuerpo humano. Dado que solamente el lugar de unión de antígenos de las CDR, en vez de la totalidad del dominio variable del anticuerpo del roedor, por ejemplo, anticuerpo de ratón, son objeto de transplante, el anticuerpo humanizado resultante (anticuerpo de "segunda generación") es menos inmunogénico que un anticuerpo quimérico.

En los experimentos de la invención se obtuvieron dos versiones de anticuerpo humanizado por injerto de CDR. Estos anticuerpos muestran afinidad a FAP con K_D de 30-40 nM, determinado por análisis de Resonancia Superficial Plasmon.

De manera alternativa al injerto CDR se puede humanizar MFP5 por la llamada tecnología de reconstrucción superficial ("resurfacing") de manera que los armazones murinos se dejan sin cambios a excepción de los residuos expuestos a la superficie, tal como se describe en el documento US 5.639.641.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para la cadena ligera y la cadena pesada se pueden sintetizar químicamente y enzimáticamente por métodos estándar (amplificación PCR). En primer lugar, se pueden sintetizar oligonucleótidos adecuados con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Gait, 1984), que se pueden utilizar para producir un gen sintético. Los métodos para generar genes sintéticos a partir de oligonucleótidos son conocidos

en la técnica (por ejemplo, Stemmer y otros, 1995; Ye y otros 1992; Hayden y Mandeck, 1988; Frank y otros, 1987).

En otra realización el anticuerpo es un anticuerpo MFP5, preferentemente un anticuerpo humanizado, reconociendo un epitopo dentro de la secuencia FAP que se solapa con el epitopo reconocido por MFP5. Los epitopos solapados pueden ser determinados, por ejemplo, por unión competitiva. La unión competitiva es determinada en el ensayo ELISA utilizando capas con recubrimiento de proteína FAP o péptidos FAP o con células FAP positivas (células ELISA) y midiendo la unión del anticuerpo MFP5 biotinilado en presencia de un anticuerpo competidor. En presencia de un anticuerpo competitivo o de un fragmento derivado de anticuerpo, la unión de MFP5 biotinilado se reduce en el caso de que los anticuerpos reconozcan un epitopo compartido. Para identificar el MFP5, péptido epitopo se pueden sintetizar o producir fragmentos o polipéptidos o proteínas recombinantes cortas derivados de la secuencia FAP y medir la unión de MFP5 a dichos péptidos/polipéptidos en un ensayo ELISA. Los péptidos o fragmentos de proteínas que contienen el epitopo o moléculas de ADN que codifican dichos péptidos/fragmentos, respectivamente, pueden ser utilizados para inmunización para obtener anticuerpos reactivos con el mismo epitopo que MFP5.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se pueden clonar en un vector de expresión (o bien ambas cadenas en una molecular vector o cada cadena en una molécula vector separada) que a continuación es introducido en una célula madre. Los vectores de expresión adecuados para expresión de inmunoglobulina en células madre procarióticas o eucarióticas y métodos de introducción de vectores en células madre son bien conocidos en esta técnica. En general, el gen de inmunoglobulina de las mismas se encuentra en conexión funcional con un promotor adecuado, tal como por ejemplo un promotor de citomegalovirus

(CMV) humano, promotor de ubiquitina de hámster (WO 97/15664) o un promotor de virus de simio SV40 situado más arriba del gen Ig. Para terminación de la transcripción, se puede utilizar un lugar de terminación/poliadenilación adecuado, tal como el de la hormona de crecimiento bobina o SV40. Además, se puede incluir una secuencia amplificadora, tal como CMV o SV40. Usualmente, el vector de expresión contiene además genes marcadores de selección, tal como dihidrofolato reductasa (DHFR), glutamina sintetasa, adenosina deaminasa, genes de adenilato deaminasa o genes de resistencia a neomicina, bleomicina o puromicina. Existe a disposición comercial una serie de vectores de expresión que se pueden conseguir de empresas, tal como Stratagene, La Jolla, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; Promega, Madison, WI or BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA. Por ejemplo, se pueden utilizar para expresión los vectores pAD-CMV1 (NCBI N° de Acceso a GenBank A32111) ó pAD-CMV19 (NCBI N° de Acceso a GenBank A32110). La célula madre es preferentemente una célula madre de mamífero, por ejemplo, una célula COS, CHO o BHK, más preferentemente una célula de ovario de hámster chino (CHO), por ejemplo células CHO-DUKX (Urlaub y Chasin, 1980), CHO-DG44 (Urlaub y otros, 1983) o CHO-K1 (ATCC CCL-61). La célula madre es cultivada a continuación en el medio de cultivo adecuado en condiciones en las que se produce el anticuerpo y el anticuerpo es aislado a partir del cultivo, de acuerdo con procedimientos estándar. Los procedimientos para la producción de anticuerpos a partir de ADN recombinante en células madre y vectores de expresión respectivos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, WO 94/11523, WO 97/9351, EP 0 481 790, EP 0 669 986).

Un ejemplo de anticuerpo anti-FAP humanizado es BIBH1, que ha sido utilizado en algunos experimentos comparativos de la invención. Contiene una secuencia de aminoácido (región

variable de la cadena ligera) igual que en la SEQ ID NO:2 de WO 99/57151, además contiene una secuencia de aminoácido (región variable de la cadena pesada), tal como se indica en SEQ ID NO:12 de WO 99/57151 y contiene además una secuencia de aminoácido (región constante de la cadena ligera) tal como se indica en SEQ ID NO:20 de WO 99/57151 y una secuencia de aminoácido (región constante de la cadena pesada) tal como se indica en SEQ ID NO:22 de WO 99/57151.

En otro aspecto, la molécula del anticuerpo MFP5 es un fragmento del anticuerpo MFP5. Para obtener fragmentos de anticuerpo (por ejemplo fragmentos Fab se puede conseguir la digestión por medio de técnicas rutinarias, por ejemplo, utilizando papaína. Se describen ejemplos de digestión de papaína en los documentos WO 94/29348 y US 4.342.566. La digestión de papaína de anticuerpo produce de manera típica dos fragmentes de unión de antígenos idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno con un único lugar de unión de antígeno y un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina da lugar a un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos lugares de combinación de antígeno y que es capaz de reticular el antígeno.

Los fragmentos Fab obtenidos por digestión del anticuerpo contienen también los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por el hecho de contener residuos adicionales del terminal carboxi en el dominio CH_1 de la cadena pesada incluyendo una o varias cisteínas procedentes de la zona de charnela del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se utiliza en esta descripción para Fab', en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas charnela entre ellos. También se pueden

generar fragmentos de anticuerpo por métodos de biología molecular, produciendo los fragmentos respectivos de ADN que codifican.

Las moléculas del anticuerpo MFP5 pueden contener la
5 totalidad o solamente una parte de la región constante, siempre que muestren unión específica a la parte relevante del antígeno. La elección del tipo y longitud de la región constante depende de si el efector funciona como fijación complementaria o si se desea toxicidad celular dependiente
10 del anticuerpo y de las características farmacológicas deseadas de la proteína del anticuerpo. La molécula del anticuerpo será típicamente un tetrámero consistente en dos pares de cadenas ligera/pesadas, pero también puede ser un dímero, es decir, consistiendo en un par de cadena
15 ligera/cadena pesada, por ejemplo, fragmento Fab ó Fv, o puede ser un anticuerpo de cadena única, monómero (scFv; Johnson y Bird, 1991).

En otra realización, la molécula de anticuerpo MFP5 puede ser una llamada "molécula similar a anticuerpo" (que se
20 considera un derivado de un anticuerpo MFP5) que es un polipéptido que contiene secuencias cortas o fragmentos de inmunoglobulinas. En particular, estos son polipéptidos que contienen una o varias regiones de unión de antígeno que son idénticas o similares a una región determinante de
25 complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina. Estas moléculas pueden ser también minicuerpos o anticuerpos de dominio único, por ejemplo, los llamados "nanocuerpos", que son microarmazones que comprenden una secuencia polipéptido CDR2 ó CDR3 que interconecta fragmentos de las secuencias de
30 polipéptido del armazón adyacente que están dispuestas para formar dos cadenas antiparalelas (descritas, por ejemplo, en WO 03/050531 y por Revets y otros, 2005). Otros ejemplos para moléculas similares a anticuerpos (o derivados de anticuerpo MFP5) son los anticuerpos de la superfamilia de

inmunoglobulina (IgSF; Srinivasan 2005), anticuerpos camelizados u otras moléculas que contienen CDR o CDR injertado o "anticuerpo de dominio" (dAb). Los dAB son unidades de anticuerpos de unión funcional, correspondiendo a regiones variables de la cadena pesada (VH) o ligera (VL) de anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular aproximadamente de 13 kDa, o menos de la décima parte de la dimensión de un anticuerpo entero. Se ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y altamente funcionales de dAbs VH y VL completamente humanos. Los dAb se encuentran a disposición también para "direccionado dual", es decir, son dAb que se unen además de a FAP, a una segunda diana en una molécula. Las bibliotecas de dAb, los métodos de selección y rastreo, los formatos de dAb para direccionado dual y para conseguir una media vida en suero prolongada se describe, por ejemplo, en la patente US 6.696.245, WO 04/058821, WO 04/003019 y WO 03/002609.

En general, los fragmentos de anticuerpo y derivados (moléculas similares a anticuerpo) se expresan bien en sistemas de células bacterianas, de levaduras y de mamíferos.

De manera alternativa, la molécula de MFP5 similar a anticuerpo puede ser llamada "SMIP" ("Small Modular Immunopharmaceutical") (Inmunofarmacéutica Modular Pequeña). Esta molécula utiliza una sola cadena de polipéptido como dominio de unión Fv que está enlazada a una cadena única de tipo charnela y dominios efectores que carecen del dominio constante CH1 (WO 02/056910). Las moléculas pueden ser preparadas como monómeros o dímeros, pero no asumen la estructura de dímero de dímeros de los anticuerpos tradicionales.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un inmunoconjugado de fórmula



en el que

A es una molécula de anticuerpo MFP5, tal como se ha definido en lo anterior;

L es una fracción de enlace;

B un agente citotóxico; y

5 n es un número decimal con $h = 1$ a 10.

En lo que sigue, los inmunocombinados que contienen un anticuerpo MFP5 (molécula) se designan "combinados MFP5 (inmuno)".

Los inmunocombinados que contienen el anticuerpo monoclonal murino MFP5 se ha demostrado que son eficaces en la destrucción de diferentes tumores asociados con fibroblastos estromales activados; los combinados de MFP5 son, por lo tanto, útiles para la terapia de dichos tumores. De manera alternativa, en vez de utilizar un inmunocombinado MFP5, el anticuerpo MFP5 (molécula) puede ser utilizado como tal, es decir, en forma no combinada.

El compuesto B, que es tóxico con respecto a las células, es un agente citotóxico.

De acuerdo con la invención, la molécula de anticuerpo MFP5 definida en lo anterior está químicamente acoplada a cualquier agente citotóxico adecuado, particularmente un agente citotóxico que induce citotoxicidad (por ejemplo, apoptosis o paro mitótico) de células de tumor para formar un inmunocombinado, según la invención. Como resultado de los mecanismos normales de eliminación farmacológica, un anticuerpo utilizado en un combinado medicamentoso establece contacto y se une a células diana solamente en proporciones limitadas. Por lo tanto, el agente citotóxico utilizado en el combinado debe ser altamente citotóxico, de manera que tenga lugar una exterminación celular suficiente para elicitar un efecto terapéutico. Tal como se describe en el documento US 2004/0241174, se incluyen entre los ejemplos de dichos agentes citotóxicos los taxanos (ver, por ejemplo, WO 01/38318 y WO 03/097625), agentes alquilantes de ADN (por

ejemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, doxorubicina, auristatina E y agentes citotóxicos que comprenden una fracción reactiva de polietilen glicol (ver, por ejemplo, 5 Sasse y otros, 2000; Suzawa y otros,, 2000; Ichimura y otros, 1991; Francisco y otros, 2003; US 5.475.092, US 6.340.701, US 6.372.738 y US 6.436.931, US 2001/0036923, US 2004/0001838, US 2003/0199519 y WO 01/49698).

En una realización preferente, el agente citotóxico es 10 un maitansinoide, es decir, derivado de maitansina (CAS 35846538).

Tal como se describe en el documento US 2004/02241174, los maitansinoides son conocidos en la técnica por incluir maitansina, maitansinol, C-3 ésteres de maitansinol y otros 15 análogos de maitansinol y derivados de los mismos (ver, por ejemplo US 5.208.020 y US 6.441.163). Los C-3 ésteres de maitansinol pueden presentarse de forma natural o se pueden derivar sintéticamente. Además, tanto los ésteres de maitansinol C-3 de tipo natural como sintéticos pueden ser 20 clasificados como C-3 éster con simples ácidos carboxílicos o un C-3 éster con derivados de N-nietil-L-alanina, siendo esta última más citotóxica que la primera. Los análogos maitansinoides sintéticos son también conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, por Kupchan y otros, (1978). Se 25 describen métodos para generar maitansinol y análogos y sus derivados, por ejemplo, en US 4.151.042.

Se pueden aislar maitansinoides adecuados para su utilización en los inmunoconjugados de la invención a partir de fuentes naturales, o bien pueden ser producidos 30 sintéticamente o semisintéticamente utilizando métodos conocidos en la técnica. Además, el maitansinoide puede ser modificado de cualquier manera adecuada siempre que se conserve suficiente citotoxicidad en la molécula conjugada final. A este respecto, los maitansinoides carecen de grupos

funcionales adecuados a los que se puedan enlazar anticuerpos. Una fracción de enlace es utilizada de manera ventajosa para enlazar el maitansinoide al anticuerpo para formar el conjugado. La fracción de enlace contiene una unión
5 química que permite la activación de la citotoxicidad maitansinoide en un lugar específico. Se conocen uniones químicas adecuadas en la técnica y estas incluyen uniones de bisulfuro, uniones de ácido lábil, uniones fotolábiles, uniones lábiles de peptidasa, uniones de tioéter formadas
10 entre grupos sulfihidrilo y maleimida y uniones lábiles de esterasa. En una realización preferente, la fracción de enlace comprende un enlace de bisulfuro o un enlace de tioéter. De acuerdo con la invención, la fracción de enlace comprende preferentemente un grupo químico reactivo. Son
15 grupos químicos reactivos especialmente preferentes los grupos N-succinimidilo y N-sulfosuccinimidilo. En una realización preferente, el grupo químico reactivo puede ser unido de forma covalente al maitansinoide con intermedio de una unión de bisulfuro entre grupos tiol. De este modo, un
20 maitansinoide modificado de la forma que se describe comprende preferentemente un grupo tiol. Un técnico ordinario en la materia apreciará que un grupo tiol contiene un átomo de azufre unido a un átomo de hidrógeno y se hace típicamente referencia al mismo en la técnica como grupo sulfhidrilo, que
25 se puede indicar como "-SH" ó "RSH".

Los maitansinoides especialmente preferentes que comprende una fracción de enlace que contiene un grupo químico reactivo son C-3 ésteres de maitansinol y sus
análogos en los que la fracción de enlace contiene un enlace
30 bisulfuro y el grupo reactivo químico comprende un éster de N-succinimidilo o N-sulfosuccinimidilo. Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como posición para enlazar químicamente la fracción de enlace. Por ejemplo, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada

con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo son todas ellas utilizables. La fracción de enlace está enlazada muy preferentemente a la posición C-3 del maitansinol. De modo más preferente, el maitansinoide utilizado en relación con el
5 inmunocóncugado de la invención es N^{2'}-deacetil-N^{2'}-(-3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N^{2'}-deacetil-N^{2'}-(-4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4).

Las fracciones de enlace con otras uniones químicas
10 pueden ser también utilizadas en el contexto de la invención, tal como lo pueden ser otros maitansinoides. Se incluyen entre los ejemplos específicos de otras uniones químicas enlaces ácidos lábiles, enlaces de tioéter, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de peptidasa y enlaces lábiles
15 de esterasa. Se deciden métodos para la producción de maitansinoides con fracciones de enlace, por ejemplo, en los documentos US 5.208.020, US 5.416.064, y US 6.333.410.

La fracción de unión de un maitansinoide forma de manera típica y preferentemente parte de una molécula de enlace más
20 grande que es utilizada para unir el anticuerpo al maitansinoide. Cualquier molécula de enlace adecuada puede ser utilizada en relación con la invención siempre que la molécula de enlace proporcione la retención de las características de citotoxicidad y direccionado del
25 maitansinoide y del anticuerpo respectivamente. La molécula de unión efectúa la unión del maitansinoide al anticuerpo a través de uniones químicas (tal como se describe en lo anterior) de manera tal que el maitansinoide y el anticuerpo están acoplados químicamente (por ejemplo, unidos de forma
30 covalente) entre sí. De manera deseable, la molécula de enlace acopla químicamente el maitansinoide al anticuerpo con intermedio de enlaces de bisulfuro o enlaces de tioéter. De manera más preferente, el anticuerpo está acoplado

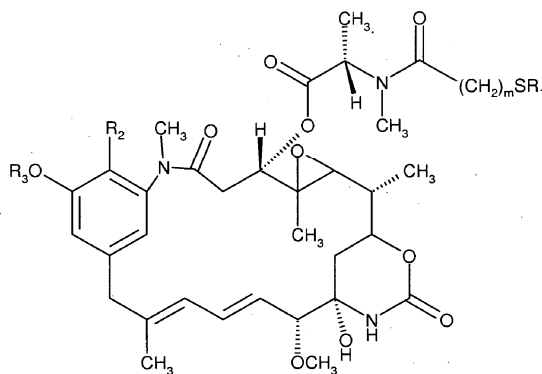
químicamente al maitansinoide con intermedio de enlaces de bisulfuro.

Se incluyen entre las moléculas de enlace especialmente preferentes, por ejemplo, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SP-DP) (ver, por ejemplo, Carlsson y otros, (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) (ver, por ejemplo., US 4.563.304), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) (ver, por ejemplo, CAS Número de registro 341498-08-6), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (ver, por ejemplo, Yoshitake y otros, Eur. J. Biochem., 101, 395-399 (1979)), y N-succinimidil 4-metil-4-[2-(5-nitro-piridil)-ditio]pentanoato (SMNP) (ver, por ejemplo, US 4,563,304). Son moléculas de enlace preferentes para su utilización en los conjugados de la invención SPP, SMCC y SPDB.

La elección del enlace depende de la situación terapéutica, mientras que la administración de los conjugados con enlaces fraccionables tiene las ventajas, especialmente para dosis reducidas, del llamado "efecto espectador", es decir, el efecto citolítico de la toxina sobre las células circundantes que no son direccionadas directamente por la parte anticuerpo de los inmunconjugados, conteniendo el sistema de enlace un enlazador no fracturable (por ejemplo, un enlazador tioéster SMCC) ofrece la posibilidad de un conjugado de medicamento anticuerpo con menor toxicidad y una ventana terapéutica más amplia.

A título de ejemplo, el conjugado de maitansinoide del anticuerpo MFP5 de la invención se puede preparar a partir de un maitansinoide de fórmula

Formula (II)



en la que

R_1 representa H o SR_4 , en el que R_4 representa metilo, etilo, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo simple o sustituido o heterocíclico;

R_2 representa Cl o H;

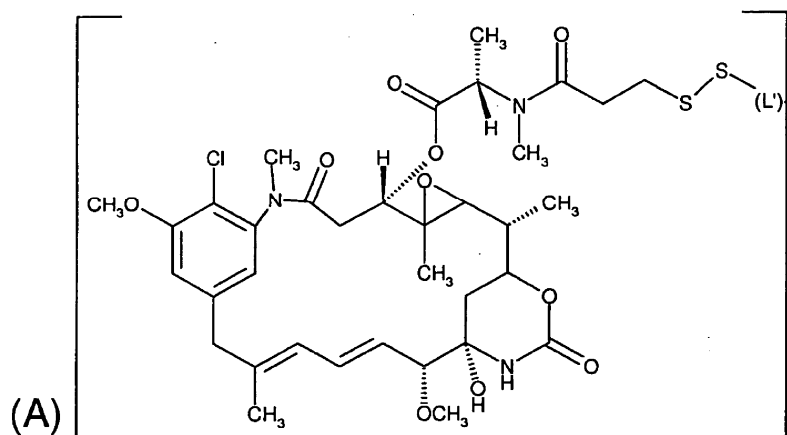
R_3 representa H o CH_3 ; y

m representa 1, 2 ó 3.

Preferentemente, R_1 es H, CH_3 , o SCH_3 , R_2 es Cl, R_3 es CH_3 , y m = 2.

El maitansinoide con $R_1=H$, $R_2 = Cl$, $R_3 = CH_3$, y m = 2 se designa DM1 en la literatura.

En una realización, el inmunocombinado de la invención tiene la fórmula



(Formula III)

15

en la que

A es una molécula de anticuerpo MFP5, tal como se ha definido en lo anterior,

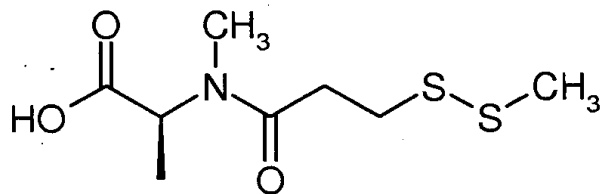
(L') es una fracción de enlace opcional;

p es un número decimal con $p = 1$ a 10 .

5 Preferentemente p es de 2 a 4.

Tal como se ha indicado, los métodos para la preparación de dichos maitansinoides son conocidos en la técnica (ver en particular US 5.208.020, Ejemplo 1); también se ha descrito en WO 02/094325 para generar un conjugado maitansinoide del anticuerpo anti-CD44.

De forma conveniente, en una primera etapa, el maitansinoide C-3 éster ansamitocina P3 puede ser producido por fermentación bacteriana de microorganismos que pertenecen al género *Nocardia* o *Actinosynnema*, por ejemplo ATCC 31565, 15 ATCC 31281 (US 4.356.265; US 4.450.234; WO 01/77360). La ansamitocina P3 puede ser extraída de un cultivo utilizando disolventes orgánicos tales como acetato de etilo o tolueno, siendo purificado posteriormente por adsorción cromatográfica utilizando, por ejemplo, gel de sílice. Entonces se puede 20 reducir a maitansinol utilizando LiAlH_4 (US 4.360.462) o, tal como se ha sugerido más recientemente, $\text{LiAl}(\text{OMe})_3\text{H}$ u otros hidruros LiAl o NaAl (WO 02/16368). El maitansinol puede ser esterificado en la posición C-3 con derivados de N-metil-L-alanina o N-metil-L-cisteína para conseguir un maitansinoide 25 que contiene bisulfuro (US 5.208.020; US 5.416.064; US 6.333.410), utilizando, por ejemplo, dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y cantidades catalíticas de cloruro de zinc (US 4.137.230; US 4.260.609). En una realización preferente, el maitansinoide es esterificado con el compuesto N-metil-N-(3-metilditiopropanoil)-L-alanina de la fórmula 30



para conseguir el maitansinoide de fórmula (II) con $R_1=SR_4$, $R_4 = CH_3$, $R_2 = Cl$, $R_3 CH_3$, y $m = 2$.

El grupo tiol libre puede ser liberado a continuación
5 por fraccionamiento del enlace bisulfuro con ditiatretitol (DTT) para conseguir, por ejemplo, DM1.

El inmunoc conjugado de la invención puede ser formado utilizando cualquier método, por ejemplo, utilizando los métodos descritos para generar los conjugados maitansinoides
10 anti-CD44 (WO 02/094325). Después de fraccionamiento intracelular, el maitansinoide libre es liberado del conjugado $A(LB)_n$. El medicamento libre que se ha liberado del inmunoc conjugado de la invención $A(LB)_n$ puede tener la fórmula B-X, en la que X es un átomo o un grupo químico, dependiendo
15 de la naturaleza de la reacción de fraccionamiento. Preferentemente, X es un átomo de hidrógeno tal como por ejemplo cuando la fracción de unión es solamente un enlace covalente entre dos átomos de azufre o un grupo hidroxilo. El lugar de fraccionamiento puede encontrarse también dentro de
20 la fracción de unión si la fracción de unión es un grupo químico, generando medicamento libre de fórmula B-L''-X después del fraccionamiento, en la que X es un átomo o un grupo químico, dependiendo de la naturaleza de la reacción de fraccionamiento. Preferentemente, X es un átomo de hidrógeno
25 o un grupo hidroxilo.

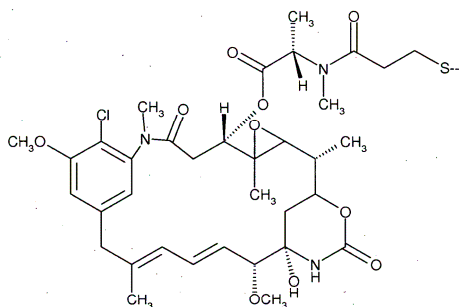
En una realización preferente, la fórmula del inmunoc conjugado (I) es menos tóxica que el compuesto tóxico B, B-X o B-L''-X que se ha liberado por la segmentación intracelular. Se conocen procedimientos para comprobar la

citotoxicidad in vitro en esta técnica (Goldmacher y otros, 1985; Goldmacher y otros, 1986; ver también US 5.208.020, Ejemplo 2). Preferentemente, el inmunoconjugado (I) es 10 veces o más, más preferentemente 100 veces o más o incluso 5 1000 veces o más, menos tóxico que el medicamento libre liberado después de la segmentación.

Preferentemente, los conjugados maitansinoides de la molécula del anticuerpo MFP5 son los que se unen con intermedio de un enlace bisulfuro, tal como se ha indicado 10 anteriormente, que son capaces de facilitar moléculas maitansinoides. Estos conjugados de unión celular son preparados por métodos conocidos, tales como la modificación de anticuerpos monoclonales con succinimidil piridil-ditiopropionato (SPDP) o pentanoato (SPP) (carlsson y otros, 15 1978). El grupo tiopiridilo resultante es desplazado a continuación por tratamiento con maitansinoides que contienen tiol para producir conjugados enlazados por bisulfuro. De manera alternativa, en el caso de los arilditiomaitansinoides, la formación del conjugado del 20 anticuerpo es efectuada por desplazamiento directo del ariltiol del maitansinoide por grupos sulfidrilo anteriormente introducidos en las moléculas del anticuerpo. Los conjugados que contienen de 1 a 10 medicamentos maitansinoides enlazados con intermedio de un puente de bisulfuro son preparados 25 fácilmente por cualquier método. En este contexto se comprende que el número decimal n en la fórmula $A(LB)_n$ es un número promedio dado que no todas las moléculas conjugadas de una preparación determinada pueden tener el entero idéntico de residuos LB fijado a la molécula de anticuerpo.

30 El maitansinoide es enlazado preferentemente al anticuerpo MFP5 mediante una fracción bisulfuro y tiene la fórmula

Formula (IV)



en la que el enlace al anticuerpo tiene lugar a través del átomo de azufre mostrado en la fórmula IV a un segundo átomo de azufre presente en la molécula de anticuerpo. Para crear este átomo de azufre disponible para la unión, una molécula de anticuerpo se puede modificar por introducción de un enlazador adecuado tal como se ha indicado en lo anterior. Preferentemente, el maitansinoide es enlazado a la molécula de anticuerpo a través de un grupo $-S-CH_2CH_2-CO-$, a $-S-CH_2CH_2CH_2CH_2-CO-$ o un grupo $-S-CH(CH_3)CH_2CH_2-CO-$. El átomo de azufre en dicho grupo enlazador forma el enlace de bisulfuro con el maitansinoide, mientras que la función carbonilo puede ser unida a una función amino presente en la cadena lateral de un residuo de aminoácido de la molécula del anticuerpo.

De esta manera, uno o varios residuos maitansinoides pueden ser enlazados a una molécula de anticuerpo. Preferentemente 2 a 4 residuos maitansinoides son enlazados a una molécula de anticuerpo.

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un inmunoconjugado de fórmula (I) que comprende las etapas:

- (a) introducir grupos libres o protegidos tiol en una molécula de anticuerpo MFP5;
- (b) hacer reaccionar la molécula de anticuerpo de la etapa (a) con maitansinoide, y
- (c) recuperar el inmunoconjugado resultante MFP5.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula del anticuerpo MFP5 de la invención o un inmunoconjugado de la invención de fórmula (I), preferentemente junto con un
5 portador farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente.

Los portadores, diluyentes y excipientes aceptables farmacéuticamente de forma adecuada son bien conocidos y pueden ser determinados por los técnicos en la materia, según requiere la situación clínica. Se incluyen entre los ejemplos
10 de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados: (1) solución salina tamponada de fosfato Dulbecco, pH aproximadamente de 7,4, conteniendo aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) 0,9 % de solución salina (0,9% peso/volumen NaCl) y (3) 5% (p/v) de dextrosa.
15 Un ejemplo para la composición farmacéutica utilizable para el inmunoconjugado de la invención se describe en el documento US 2004/0241174.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser utilizadas para todos los tipos de aplicaciones clínicas
20 o no clínicas en las que se tiene que dirigir un maitansinoide a células que expresan FAP, en particular a células de tumores humanos o fibroblastos estromales humanos.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una molécula de anticuerpo y/o de inmunoconjugado de la invención
25 y un portador farmacéuticamente aceptable son útiles para tratar enfermedades tumorales asociadas con fibroblastos estromales y/o tumores que expresan FAP. En particular, la composición farmacéutica de la invención es útil para el tratamiento de enfermedades tumorales seleccionados entre el
30 grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de seno, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cánceres de pulmón, cánceres invasivos de vejiga, cánceres pancreáticos y cánceres metastáticos del cerebro, carcinoma de células escamosas de

cabeza y cuello (SCC), SCC de esófago, SCC de pulmón, SCC de piel, melanoma, adenocarcinoma de seno (AC), AC de pulmón, SCC de cérvix, AC de páncreas, AC de colon o AC de estómago, cánceres de tiroides, cáncer de próstata, osteosarcoma (OS) o
5 sarcoma de tejidos blandos. Además, los tumores benignos que expresan FAP, por ejemplo tumores desmoides, pueden ser tratados con el inmunoconjugado de la invención.

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de cáncer que comprende la
10 aplicación de la composición farmacéutica, tal como se ha descrito en lo anterior a un paciente. En particular, este aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de cáncer a un paciente que lo requiere comprendiendo la administración al paciente de una cantidad
15 terapéuticamente eficaz de un inmunoconjugado, tal como se ha descrito en lo anterior o un compuesto farmacéutico, tal como se ha descrito en lo anterior, para las indicaciones de cáncer que se han definido anteriormente.

Para el tratamiento clínico del cáncer, el
20 inmunoconjugado de fórmula (I) de acuerdo con la invención puede ser suministrado en la forma de una solución testada en cuanto a esterilidad y a niveles de endotoxina. Ejemplos de protocolos adecuados de administración de inmunoconjugados son los siguientes: los conjugados pueden ser administrados
25 semanalmente durante 1 a 6 semanas como bolo i.v. o como infusión continua durante 5 días. Las dosis de bolo pueden ser administradas en 50 a 100 ml de solución salina normal a la que se han añadido de 5 a 10 ml de seroalbúmina humana. Se pueden administrar infusiones continuas en 250 a 500 ml de
30 solución salina normal, a la que se han añadido de 25 a 50 ml de seroalbúmina humana para cada periodo de 24 h. Las dosificaciones serán en general de 10 mg a 400 mg/m² de área superficial del cuerpo por cada aplicación. La dosis aplicada al paciente por administración tiene que ser suficientemente

elevada para ser efectiva, pero se debe encontrar por debajo de la dosis límite de toxicidad (DLT). En general, una dosis suficientemente bien tolerada por debajo de DLT será considerada la dosis tolerada máxima (MTD). El experto sabe como determinar la MTD (Lambert y otros, 1998). Para administraciones semanales la MTD se puede esperar que se encuentre en un rango de 100 a 200 mg/m². De manera alternativa, los intervalos entre aplicaciones pueden ser más prolongados, por ejemplo, de dos a cuatro semanas, preferentemente tres semanas. En este caso, la MTD se puede esperar que se encuentre en un rango de 200 a 300 mg/m². De manera alternativa, la aplicación puede tener lugar en 5 dosis diarias seguidas de un descanso de varias semanas después del cual se puede repetir el tratamiento. En este caso, la MTD por administración se puede esperar que sea inferior a 100 mg/m². Por ejemplo, se pueden administrar conjugados como infusión única i.v. con una tasa de 3 mg/min cada 21 días. Hasta 7 ciclos de tratamiento han sido aplicados. Se debe comprender que las dosis aplicadas pueden encontrarse fuera de los rangos indicados anteriormente si la situación clínica lo requiere. Por ejemplo, si la MTD resulta más elevada que la indicada, la administración única puede tener lugar a una dosis más elevada de 400 mg/m² o semanalmente puede ser superior a 200 mg/m². La cantidad del conjugado aplicada dependerá también del tipo del enlazador; para enlazadores segmentables, tal como se ha mencionado anteriormente, pudiendo permitir el efecto de espectador más elevado por la toxina liberada pudiendo permitir dosificaciones más bajas que cuando se utiliza un conjugado no segmentable.

La dosis, ruta de administración, esquema de aplicación, repetición y duración de tratamiento dependerán en general de la naturaleza de la enfermedad (tipo, grado y etapa del tumor, etc.) y del paciente (constitución, edad, sexo, etc.)

y se determinará por el experto médico responsable del tratamiento. Además del tratamiento de tumores sólidos, la aplicación terapéutica, según la invención puede ser ventajosa como coadyuvante en intervenciones quirúrgicas para
5 tratar residuos mínimos de la enfermedad.

Los anticuerpos y los inmunoconjugados de la invención pueden ser utilizados también para la terapia de enfermedades en las que se involucra causalmente la expresión de FAP, por ejemplo, para la terapia de artritis reumatoide.

10 En una realización adicional, la invención se refiere a la utilización de un anticuerpo según la invención y/o un inmunoconjugado de fórmula (I) para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer y de artritis reumatoide.

15 Breve descripción de las figuras:

Figura 1: comparación de la afinidad de unión de anticuerpos anti-FAP y sus conjugados DM1 en ELISA celular sobre células de fibrosarcoma FAP-positivas.

20 Figura 2: eficacia del tratamiento de MFP5-DM1 en ratones inmunodeficientes xenoinjertados con tumores pancreáticos humanos.

Figura 3: eficacia del tratamiento de MFP5-DM1 en ratones inmunodeficientes xenoinjertados con tumores de pulmón humanos.

25 Figura 4: eficacia del tratamiento de MFP5-DM1 en ratones inmunodeficientes xenoinjertados con tumores de cabeza y cuello humanos.

30 Figura 5A: comparación de la eficacia de conjugados maitansinoides de MFP5 con 3 enlazadores diferentes en el tratamiento de ratones inmunodeficientes xenoinjertados con cáncer pancreático humano.

Figura 5B: comparación de la eficacia de conjugados maitansinoides de MFP5 con 3 enlazadores diferentes en el

tratamiento de ratones inmunodeficientes xenoinjertados con cáncer de pulmón.

Figura 5C: comparación de la eficacia de conjugados maitansinoides de MFP5 con 3 enlazadores diferentes en el
5 tratamiento de ratones inmunodeficientes xenoinjertados con tumores de cabeza y cuello.

Figura 6: expresión de FAP en cánceres de tiroides.

Ejemplo 1

Generación de inmunoconjugados maitansinoides del
10 anticuerpo anti-FAP

1.1. Generación de anticuerpos

1.1.1. Anticuerpo anti-FAP BIBH1:

El anticuerpo humanizado BIBH1 (también designado sibrotuzumab), derivado del anticuerpo monoclonal F19, se
15 obtiene tal como se describe en el documento WO 99/57151. Este anticuerpo reacciona con FAP humano pero no reacciona con FAP de ratón.

1.1.2. Anticuerpo monoclonal anti-FAP MFP5:

La línea celular de hidridoma que segrega el MFP5
20 monoclonal murino es generada, tal como se describe en el documento WO 95/33771 para VFF 18, excepto que se utilizan para inmunización de ratones transgénicos FAP-/- (Niedermeyer y otros, 2000) cepa C57BL/6 debido a la elevada homología de FAP humano y murino. El antígeno utilizado para inmunización
25 es la proteína de fusión CD8-FAP murino (SEQ ID NO: 5; Niedermeyer 1998). La reactividad cruzada del anticuerpo segregado MFP5 con respecto a FAP humano se verifica utilizando un ensayo celular ELISA (ver ejemplo 2) sobre la línea de fibrosarcoma humano recombinante HT1080 (HT1080;
30 ATCC CCL 121), clon v1.33, expresando FAP humano (obtenido transfectando células HT1080 con FAP humano que codifica cADN). Los resultados se han indicado en el ejemplo 2, figura 1.

El anticuerpo es purificado del sobrenadante de cultivo celular sobre una columna de sefarosa A proteína.

1.1.3. Anticuerpo quimérico cMFP5:

Se extrae mRNA de la línea celular de hibridoma MFP5 que
5 segrega el anticuerpo MFP5. En reacciones subsiguientes
RT-PCR, el ADN de cadena ligera variable y el ADN de cadena
pesada variable son amplificados utilizando cebadores
específicos homólogos para las secuencias conductoras
conocidas (cebadores delanteros) y a la región constante
10 (cebadores traseros) de las inmunoglobulinas de cadena pesada
y ligera murino (Jones y Bendig, 1991). Las secuencias de
cadena variable son clonadas a continuación, de acuerdo con
ello, en un vector de expresión de mamífero que contiene la
secuencia de región constante de la cadena ligera kappa
15 humana y la cadena pesada IgG1 humana. El anticuerpo MFP5
quimérico es expresado a continuación de forma transitoria en
células HEK 293 y purificado sobre una columna de sefarosa de
proteína A.

1.2. Generación de conjugados de anticuerpo-DM1:

20 En anticuerpo monoclonal murino MFP5 y el anticuerpo
recombinante humanizado BIBH1 son enlazados al maitansinoide
DM1, tal como se describe por Chari y otros, 1992; Liu y
otros, 1996; US 5.208.020. Los conjugados son designados
BIBH1-DM1 y MFP5-DM1, respectivamente. (En los siguientes
25 ejemplos, si no se dice lo contrario, la designación "MFP5-
DM1" significa MFP5-SPP-DM1, es decir, el inmunoconjugado
enlazado con bisulfuro.

Las fracciones de las muestras de conjugado DM1 del
anticuerpo son ensayadas en cuanto al número de moléculas de
30 DM1 enlazadas por molécula de anticuerpo. (Las moléculas de
DM1 enlazadas son determinadas midiendo la absorbancia a 252
nm y 280 nm). La proporción DM1/MAb en a solución recogida se
observa que es de 2,6-3,25 y el rendimiento del anticuerpo

conjugado es, como mínimo, del 50% basado en el anticuerpo inicial.

Ejemplo 2

Análisis de unión in vitro de BIBH1-DM1 y MFP5-DM1 en
5 comparación con la unión de anticuerpos parentales

La unión de los anticuerpos BIBH1 y MFP5 y de los respectivos conjugados de anticuerpo BIBH1-DM1 y MFP5-DM1 a células HT1080 positivas y negativas al antígeno se determina en un ensayo celular ELISA. La unión a FAP humano es
10 monitorizada en la línea celular recombinante HT1080 v1.33 y la unión al FAP murino en el clon 13.6 de la línea celular recombinante HT1080. Para la generación de HT1080 13.6 se clona cADN de FAP murino (Niedermeyer y otros, 1998) y se liga en el plásmido de expresión pZeoSV2(+) (Invitrogen). Se
15 generan clones estables, tal como se describe para HT1080 v1.33 y clones positivos para FAP murino son rastreados con el anticuerpo monoclonal específico FAP murino 3D11 (Niedermeyer y otros, 2000). Para el ensayo celular ELISA se siembran 100 μ l de suspensiones de células a varias
20 densidades de células por pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y las células son incubadas durante una noche en un incubador (37°C, 5% CO₂). Al día siguiente, las células son fijadas con 100% de etanol. Las diluciones de los anticuerpos BIBH1 y MFP5 y los conjugados
25 BIBH1-DM1 y MFP5-DM1 se añaden en duplicados y se incuban durante dos horas. Después de lavado tres veces con PBS/Tween, se añade conjugado de peroxidasa anti-humana-IgG de conejo, diluida, para detección de los anticuerpos BIBH1 y para detección de los anticuerpos MFP5 se añade un conjugado
30 de peroxidasa de cabra anti-ratón-Ig diluida. Después de incubación durante dos horas en placas RT se lava nuevamente tres veces con PBS/Tween y los anticuerpos anti-FAP unidos son detectados por adición de una solución de marcado TMB.

Tal como se ha mostrado en la figura 1, la conjugación con DM1 no altera la afinidad de unión de los anticuerpos BIBH1 y MFP5. Además, la figura 1 muestra que MFP5, pero no BIBH1 se une tanto a FAP humano como murino:

- 5 A: Unión a HT1080 v1.33 expresando FAP humano. La afinidad de unión de los anticuerpos se conserva después de conjugación a DM1.
- B: Unión a HT1080 13.6 expresando FAP murino. Solamente se une el anticuerpo murino específico MFP5.
- 10 C: Control negativo. La línea celular parental HT1080 no muestra expresión FAP endógena.

Ejemplo 3

Ensayo de citotoxicidad in Vitro

100 µl de suspensiones de células de HT1080 y del clon
15 HT1080 v1.33 FAP positivo a diferentes densidades de células son sembradas por pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y las células son incubadas durante una noche en un incubador (37°C, 5% CO₂). Al día siguiente, se añaden diluciones del conjugado citotóxico MFP5-DM1 en duplicados y
20 las células son incubadas durante otros tres días. Las células restantes son marcadas por MTS y la señal es leída en un espectrofotómetro de placas de microtitulación. La concentración resultante con un efecto citotóxico al 50% (EC₅₀) se calcula utilizando el software de formación de
25 gráficos GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) utilizando una curva de ajuste sigmoideal.

El MFP5-DM1 es altamente eficaz en el exterminio de la línea celular antígeno positivo HT1080 v1.33 con valores de EC₅₀ de 0,04 nM aproximadamente. La línea celular antígeno
30 negativa HT1080 es efectuada por el conjugado solamente con concentraciones mucho más elevadas con un EC₅₀ de 59 nM aproximadamente.

Ejemplo 4

Eficacia antitumoral in vivo del inmunoconjugado MFP5-DM1 contra xenoinjertos de tumor del riñón humano que expresan FAP humano

5 La eficacia antitumoral in vivo de MFP5-DM1 es comprobada en un modelo de ratón natural aplicando el HEK293 FAP recombinante de tumor de riñón humano (células de riñón embriónico humano, ATCC, Cat. No. CRL-1573, transfectadas con FAP cADN humano, tal como se describe por Park y otros,
10 1999). Las células son cultivadas en medios RPMI 1640 que contiene 10% de suero fetal de vaca y suplementos. Se añaden 1×10^7 células tumorales (100 μ l) a 100 μ l de matrigel y se transplantan de forma subcutánea en el flanco derecho de un ratón hembra de 6 semanas NMRI-nu/nu. El tratamiento empieza
15 cuando los tumores alcanzan un tamaño promedio de 291 mm³. El tratamiento consiste en inyecciones i.v. de MFP5-DM1 con un nivel de dosis de 300 μ g DM1/kg administrado diariamente en cinco días consecutivos (un ciclo). Los animales tratados con PBS sirven como control de crecimiento del tumor. El
20 crecimiento del tumor es monitorizado midiendo las dimensiones del tumor. Se evalúa la respuesta del tumor como respuesta completa cuando el tumor ha desaparecido por completo en cualquier momento después del inicio del tratamiento.

25 Se mide el volumen promedio del tumor en ambos grupos durante el periodo de observación. En el grupo tratado con MFP5-DM1, el T/C (volumen medio del tumor de animales tratados dividido por el volumen medio del tumor de los animales de control) en el día 42 disminuye fuertemente; una
30 serie de animales muestran regresión completa del tumor. Los resultados obtenidos muestran que MFP5-DM1 muestra excelente actividad antitumoral contra tumores humanos que expresan FAP.

Ejemplo 5

Eficacia antitumoral in vivo del inmunoconjugado MFP5-DM1 contra xenoinjertos de tumor de sarcoma humano que expresan FAP

- 5 A. Eficacia antitumoral in vivo del inmunoconjugado MFP5-DM1 contra tumores de fibrosarcoma humano de HT1080 que expresan FAP humano

Se comprueba la eficacia antitumoral in vivo de MFP5-DM1 en un modelo de xenoinjerto de ratón natural aplicando la
10 línea celular HT1080 v1.33 (fibrosarcoma humano) de tumor humano que expresa FAP. Las células son cultivadas en medio RPMI 1640 conteniendo 10% de suero fetal bovino y suplementos. Se transplantan 5×10^6 células tumorales de forma subcutánea en el flanco derecho de un ratón hembra de 6
15 semanas NMRI-nu/nu. El tratamiento empieza cuando los tumores alcanzan un tamaño promedio de 29 a 38 mm³. El tratamiento consiste en inyecciones intravenosas de MFP5-DM1 administradas diariamente en 5 días consecutivos. Se comprueban 2 dosis diferentes de MFP5-DM1 en paralelo en
20 grupos de 6 ratones: 30 µg DM1/kg y 300 µg DM1/kg. Los animales tratados con PBS sirven como control de crecimiento del tumor. El crecimiento del tumor es monitorizado midiendo el tamaño del mismo.

La respuesta del tumor es evaluada como respuesta
25 completa cuando el tumor desaparece por completo en cualquier momento después del inicio del tratamiento.

Los resultados obtenidos muestran que MFP5-DM1 induce excelente respuesta antitumoral en ratones inmunodeficientes xenoinjertados HT1080 v1.33.

- 30 B. Eficacia antitumoral in vivo del inmunoconjugado MFP5-DM1 contra histiocitoma fibroso maligno humano que expresan FAP humano

Se comprueba la eficacia antitumoral in vivo de MFP5-DM1 en un modelo de xenoinjerto de ratón natural aplicando el MFSH antígeno-positivo de tumor humano (línea celular MFSH: histiocitoma fibroso maligno humano) (Takeya y otros, 1995; 5 Iwasaki y otros, 1992).

Las células son cultivadas en medio RPMI 1640 conteniendo 10% de suero fetal bovino y suplementos. Se transplantan 1×10^7 células tumorales de forma subcutánea con matrigel en el flanco derecho de un ratón hembra de 6 semanas 10 NMRI-nu/nu. Para experimentos de terapia, los tumores se mantienen por el paso de fragmentos de tumor. El tratamiento empieza cuando los tumores alcanzan un tamaño promedio de 116-131 mm³. El tratamiento consiste en inyecciones i.v. de MFP5-DM1 administradas semanalmente durante cuatro semanas. 15 Se comprueban en paralelo 3 niveles de dosis distintos de MFP5-DM1: 100 µg DM1/kg, 200 µg DM1/kg, y 400 µg DM 1/kg. Los animales tratados con PBS sirven como control de crecimiento del tumor. Un grupo es tratado con anticuerpo MFP5 no conjugado con un nivel de dosis que corresponde a la cantidad 20 de anticuerpo al nivel de dosis más elevado del inmunoconjugado MFP5-DM1. El crecimiento del tumor es monitorizado midiendo las dimensiones del tumor.

Estos resultados muestran que el conjugado MFP5-DM1 induce respuestas antitumorales en ratones inmunodeficientes 25 xenoinjertados MSFH cuando se administran una vez a la semana durante un periodo de cuatro semanas con respuesta dependiente de la dosis. El anticuerpo no conjugado no muestra efecto antitumoral en este experimento.

C. Eficacia antitumoral in vivo del inmunoconjugado 30 MFP5-DM1 contra xenoinjerto de tumor de osteosarcoma humano, que expresa FAP humano.

La eficacia antitumoral in vivo de MFP5-DM1 es comprobada en un modelo de xenoinjerto de ratón natural

aplicando un tumor derivado de osteosarcoma humano. Para experimentos de terapia los tumores son mantenidos mediante el paso de fragmentos de tumor.

Los tumores son transplantados de forma subcutánea en el flanco derecho de un ratón hembra de 6 semanas NMRI-nu/nu. El tratamiento empieza cuando los tumores alcanzan unas dimensiones de 75 - 95 mm³. Los ratones son separados al azar en tres grupos de tratamiento distintos (tres niveles de dosis distintos, 8 ratones por grupo):

El tratamiento consiste en inyecciones i.v. de MFP5-DM1 administrado diariamente en cinco días consecutivos, empezando en el día 1. Se comprueban tres niveles diferentes de dosis de MFP5-DM1: 30 µg DM1/kg, 100 µg DM1/kg y 200 µg DM1/kg. Los animales de control no son tratados (PBS) o tratados con anticuerpo no conjugado MFP5 con un nivel de dosis que corresponde a la cantidad de anticuerpo al mayor nivel de dosis del inmunoconjugado MFP5-DM1. El crecimiento tumoral es monitorizado midiendo las dimensiones del tumor.

Los resultados obtenidos muestran que el MFP5-DM1 induce respuestas antitumorales en ratones inmunodeficientes xenoinjertados con osteosarcoma cuando se administran diariamente cinco días consecutivos con respuesta que depende de la dosis. El anticuerpo no conjugado no muestra efecto antitumoral en este experimento.

Ejemplo 6

Eficacia antitumoral in vivo de inmunoconjugado de MFP5-DM1 contra xenoinjertos de tumor humano que no expresan FAP humano.

Se comprueba la eficacia antitumoral de MFP5-DM1 en ratones inmunodeficientes inoculados con células de tumor humano que no expresa FAP, derivados de cáncer pancreático humano (ejemplo 6A), cáncer de pulmón de células no pequeñas humano (ejemplo 6B) y cáncer humano de cabeza y cuello (ejemplo 6C). La expresión de FAP en fibroblastos estromales

de origen de ratón es verificado por inmunohistoquímica estándar utilizando MFP5 quimérico.

Para experimentos de terapia los tumores son mantenidos por paso de fragmentos de tumor para el cáncer humano
5 pancreático y de pulmón.

A: Modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano en ratones inmunodeficientes:

Los tumores trasplantados son transplantedos subcutáneamente al flanco derecho de un ratón hembra de 6
10 semanas NMRI-nu/nu. El tratamiento empieza cuando los tumores alcanzan un tamaño medio de 85-108 mm³.

Los ratones son distribuidos al azar en los siguientes grupos de tratamiento (8 ratones por grupo):

- Grupo 1: Control (PBS)
- 15 Grupo 2: MFP5-DM1 (400 µg DM1/kg/d)
- Grupo 3: MFP5-DM1 (200 µg DM1/kg/d)
- Grupo 4: MFP5-DM1 (100 µg DM1/kg/d)
- Grupo 5: MFP5 control (28 mg/kg/d)

El tratamiento consiste en inyecciones i.v. de MFP5-DM1
20 administrado una vez a la semana (cuatro semanas consecutivas) empezando en el día 0. Se comprueban 3 niveles de dosis distintos de MFP5-DM1: 7 mg/kg MFP5 que corresponde a 100 µg DM1/kg, 14 mg/kg MFP5 que corresponde a 200 µg DM1/kg y 28 mg/kg MFP5 que corresponde a 400 µg DM1/kg. Los
25 animales de control no son tratados (PBS) o tratados con anticuerpo no conjugado (anticuerpo de control MFP5, 28 mg/kg). El crecimiento del tumor es monitorizado midiendo el tamaño del mismo. El volumen relativo de tumor de cada grupo durante el periodo de observación se muestra en la figura 2
30 (se muestran los volúmenes relativos de tumor por grupo, los grupos de tratamiento se han indicado; en esta figura BIA 12 designa el conjugado MFP5 y BIA 13 designa el anticuerpo no conjugado MFP5).

Los tumores tratados con anticuerpo de control o a un nivel de dosis bajo de 7 mg/kg MFP5-DM1 muestran crecimiento similar a los tumores sin tratar con T/C (tratamiento con respecto a control) en el día 31 del 86% para el anticuerpo de control y 71% para los de dosis baja. En los grupos 5 tratados con 14 mg/kg/d MFP5-DM1 y 28 mg/kg/d MFP5-DM1, se observa eficacia dependiente de la dosis con T/C en el día 31 de 22% del grupo 3 tratado con 14 mg/kg/d MFP5-DM1 y T/C de 6% en el día 31 para el grupo 4 de dosis elevada tratado con 10 28 mg/kg/d MFP5-DM1.

Estos resultados demuestran que el MFP5-DM1 induce excelentes respuestas antitumorales en ratones xenoinjertados con un carcinoma pancreático humano cuando se administran una vez a la semana durante un periodo de cuatro semanas con 15 respuesta dependiente de la dosis. El anticuerpo no conjugado no muestra efecto antitumoral en este experimento.

B: Modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano en ratón natural.

Los tumores trasplantados son transplantedados de forma 20 subcutánea al flanco derecho de un ratón hembra de 6 semanas NMRI-nu/nu. El tratamiento empieza cuando los tumores alcanzan un tamaño medio de 92-120 mm³.

Los ratones son agrupados al azar en los siguientes grupos de tratamiento (8 ratones por grupo):

- 25 Grupo 1: Control (PBS)
 Grupo 2: MFP5-DM1 (400 µg DM1/kg)
 Grupo 3: MFP5-DM1 (200 µg DM1/kg)
 Grupo 4: MFP5-DM1 (100 µg DM1/kg)
 Grupo 5: MFP5 (28 mg/kg)

30 El tratamiento consiste en inyecciones i.v. de MFP5-DM1 administrado una vez a la semana (cuatro semanas consecutivas), empezando en el día 0. Se comprueban en paralelo tres niveles de dosis distintos de MFP5-DM1: 7 mg/kg/d MFP5 DM1 de conjugado correspondiente a 100 µg

DM1/kg, 14 mg/kg MFP5 DM1 de conjugado correspondiente a 200 µg DM1/kg y 28 mg/kg MFP5-DM1 de conjugado correspondiente a 400 µg DM1/kg. Los animales de control no son tratados (PBS) o tratados con anticuerpo no conjugado (anticuerpo de control MFP5, 28 mg/kg). El crecimiento del tumor es monitorizado midiendo el tamaño del mismo. El volumen relativo del tumor de cada grupo durante el periodo de observación se muestra en la figura 3 (se muestran los volúmenes correspondientes de tumor por grupo, los grupos de tratamiento se han indicado; en esta figura BIA 12 indica el conjugado MFP5 y BIA 13 designa el anticuerpo no conjugado MFP5). Los tumores tratados con anticuerpo de control mostraron crecimiento similar a los tumores no tratados con proporciones T/C en el día 21 del 107%. En los grupos tratados con 7, 14 ó 28 mg/kg/d MFP5-DM1 se observó eficacia dependiente de la dosis con proporciones T/C en el día 21 de 7,6% en el grupo 2 tratado con 28 mg/kg/d MFP5-DM1, 29% en el grupo 3 tratado con 14 mg/kg/d MFP5-DM1 y 54% en el grupo 4 tratado con 7 mg/kg/d MFP5-DM1.

Estos resultados demuestran que el MFP5-DM1 induce excelentes respuestas antitumorales contra tumores de pulmón humanos en ratones inmunodeficientes xenoinjertados cuando se administran una vez a la semana durante un periodo de cuatro semanas con respuesta dependiente de la dosis. El anticuerpo no conjugado no muestra efecto antitumoral en este experimento. Las secciones de tumor procedentes de animales tratados marcadas con hematoxilina muestran reducción drástica de las células tumorales.

C: Modelo xenoinjertado de cáncer humano de cabeza y cuello en ratones inmunodeficientes:

Se comprueba la eficacia antitumoral in vivo de MFP5-DM1 en un modelo xenoinjertado de ratón natural aplicando la línea celular tumoral humana FaDu (cáncer humano de cabeza y cuello). Las células son cultivadas en medio RPMI 1640

conteniendo 10% de suero fetal bovino y suplementos. Se transplantan 1×10^6 células tumorales subcutáneamente en el flanco derecho de un ratón hembra de 6-8 semanas NMRI-nu/nu. El tratamiento empieza cuando los tumores alcanzan un tamaño
5 medio de 72-78 mm³.

Los ratones son agrupados al azar en los siguientes grupos de tratamiento (6 ratones por grupo):

- Grupo 1: Control (PBS)
- Grupo 2: MFP5-DM1 (200 µg DM1/kg/d)
- 10 Grupo 3: MFP5-DM1 (400 µg DM1/kg/d)
- Grupo 4: MFP5 control (17 mg/kg/d)

El tratamiento consiste en inyecciones i.v. de MFP5-DM1 administrado una vez a la semana (cuatro semanas consecutivas), empezando en el día 0. Se comprueban 2 niveles
15 de dosis distintos de MFP5-DM1: 8,5 mg/kg MFP5 correspondientes a 200 µg DM1/kg y 17 mg/kg MFP5 correspondientes a 400 µg DM1/kg. Los animales de control no son tratados (PBS) o tratados con anticuerpo no conjugado (anticuerpo de control MFP5, 17 mg/kg). El crecimiento del
20 tumor es monitorizado midiendo el tamaño del mismo. El volumen relativo del tumor de cada grupo durante el periodo de observación se muestra en la figura 4 (se muestran los volúmenes correspondientes de tumor por grupo, los grupos de tratamiento se han indicado).

25 Los tumores tratados con anticuerpo de control mostraron crecimiento similar a los tumores no tratados. En los grupos tratados con 8,5 mg/kg/d MFP5-DM1 y 17 mg/kg/d MFP5-DM1 se observó eficacia dependiente de la dosis con proporciones T/C en el día 32 de 40% en el grupo 2 tratado con 8,5 mg/kg/d
30 MFP5-DM1 y T/C del 10% en el día 32 para el grupo 3 de dosis elevada tratado con 17 mg/kg/d MFP5-DM1.

Estos resultados muestran que el MFP5-DM1 induce excelentes respuestas antitumorales en ratones xenoinjertados con cáncer humano de cabeza y cuello cuando se les administra

una vez a la semana durante un periodo de cuatro semanas con respuesta dependiente de la dosis. El anticuerpo no conjugado no muestra efecto antitumoral en este experimento.

Ejemplo 7

5 Comparación de los inmunoconjugados MFP5-maitansinoides que contienen tres enlazadores distintos en su eficacia antitumoral in vivo contra xenoinjertos de tumor humano que no expresan FAP humano.

Para averiguar el mecanismo de acción del conjugado 10 maitansinoide de MFP5 se generaron conjugados adicionales de MFP5 utilizando el mismo maitansinoide, DM1, pero en vez de ser acoplados a SPP (enlace de bisulfuro), la toxina es acoplada al anticuerpo con intermedio del enlazador tioéster "no segmentable" SMCC, así como un maitansinoide modificado, 15 DM4, acoplado con intermedio del enlazador segmentable que contiene bisulfuro SPDB. (Estudios recientes han demostrado que un conjugado SPDB-DM4, pero no un conjugado SMCC-DM1 del mismo anticuerpo genera metabolitos que exterminan de manera potente las células "espectadores").

20 Para los experimentos de este ejemplo se generaron MFP5-SPDB-DM4 y MFP5-SMCC-DM1 y se caracterizaron in vitro e in vivo, tal como se ha descrito anteriormente para MFP5-DM1, conteniendo el conjugado un enlace bisulfuro. Mientras que el enlazador SPDB utilizó MFP5-DM4, de manera similar al 25 enlazador SPP utilizado en MFP5-DM1, contiene un enlace bisulfuro segmentable, un enlace tioéster no segmentable se encuentra presente en el enlazador SMCC.

En ensayos de proliferación ambos MFP5-DM4 y MFP5-SMCC-DM1 muestran similar potencia y selectividad tal como MFP5- 30 DM1 (EC50 = 29 pM y 22 pM, respectivamente, sobre células HT1080 que expresan FAP,; > 1 µM sobre células parentales FAPα negativas).

En el modelo de adenocarcinoma de páncreas, una dosis única de MFP5-DM1 ó MFP5-DM4, equivalente a 800 µg de

maitansinoide/kg, respectivamente, tiene como resultado la regresión de tumores, incluyendo la regresión completa en 3 de 8 animales tratados (figura 5A). La figura 5A muestra la cinética de crecimiento de los tumores pancreáticos humanos xenoinjertados durante el tratamiento. Los ratones son tratados por vía intravenosa con tampón citrato (cuadrado cerrado); mAbFAP5-DM1 (cuadrado abierto), mAbFAP5-DM4 (círculo cerrado), mAbFAP5-SMCC-DM1 (círculo cerrado). Los tamaños de tumor son representados como la media de ocho ratones. La flecha indica el tratamiento. Tal como se puede apreciar en la figura 5A, los tumores restantes reanudan eventualmente el crecimiento pero a una velocidad más lenta que es la que se mantuvo hasta el final del experimento en el día 75 post-tratamiento. Como contraste, el conjugado no segmentable MFP5-SMCC-DM1 al mismo nivel de dosis no muestra ninguna eficacia significativa.

En el modelo de carcinoma de pulmón (figura 5B), los conjugados son dosificados a 400 µg de maitansinoide por kg administrado una vez a la semana durante tres semanas. La figura 5B muestra la cinética de crecimiento de tumores de pulmón humano xenoinjertados durante tratamiento. Se trataron ratones por vía intravenosa con tampón citrato (cuadrado cerrado); mAbFAP5-DM1 (cuadrado abierto), mAbFAP5-DM4 (círculo cerrado), mAbFAP5-SMCC-DM1 (círculo cerrado). Los tamaños de los tumores son representados como la media de ocho ratones. Las flechas indican el tratamiento. También en este caso se puede observar que el conjugado MFP5-DM1 igual que el conjugado MFP5-DM4 inducen regresiones del tumor, incluyendo regresiones completas en animales tratados 4/8 y 4/8, respectivamente, y la tasa de crecimiento de tumores residuales es reducida hasta el final del experimento en el día 62. El nuevo crecimiento de 2 tumores se observa en ambos grupos.

Un experimento adicional de xenoinjerto es llevado a cabo utilizando la misma línea celular FaDu de carcinoma de cabeza y cuello. Los xenoinjertos FaDu subcutáneos en ratones inmunodeficientes inducen una reacción estromal menos prominente en el huésped en comparación con los otros modelos de tumor, no obstante la expresión de FAP α es sobrerregulada de manera continuada en los fibroblastos estromales del tumor. Después de una administración única de conjugados a una dosis de 600 μ g maitansinoides/kg, conjugados MFP5-DM1 y MFP5-DM4, pero no el conjugado MFP5-SMCC-DM1, muestran eficacia significativa y se observaron regresiones completas del tumor en 1/8 y 2/8 de los animales tratados, respectivamente. La figura 5C muestra la cinética de crecimiento de los tumores de cabeza y cuello humano xenoinjertados durante el tratamiento. Los ratones son tratados por vía intravenosa mediante tampón citrato (cuadrado cerrado); mAbFAP5-DM1 (cuadrado abierto), mAbFAP5-DM4 (círculo cerrado), mAbFAP5-SMCC-DM1 (círculo cerrado) y anticuerpo no conjugado (diamante abierto). Los tamaños de los tumores son representados como la media de ocho ratones. Las flechas indican el tratamiento. En todos los experimentos el tratamiento es bien tolerado y el incremento de peso de los animales es similar al del grupo de control. La razón para ello puede ser debida al hecho de que los enlazadores altamente segmentables tienen un efecto potencial más elevado para células "espectador" (mientras que el enlazador no segmentable es normalmente menos tóxico y, por lo tanto, ofrece una ventana terapéutica más grande).

Los experimentos en los tres modelos de xenoinjerto de tumor descritos en este ejemplo demuestra, a las dosis determinadas y condiciones de este experimento, que los conjugados MFP5 que contienen SPP-DM1 o SPDB-DM4 son muy eficaces en el retraso del crecimiento tumoral o en la regresión de la inducción de tumor, mientras que los

conjugados SMCC-DM1 carecen esencialmente de eficacia. Estos resultados refuerzan, por lo tanto, la hipótesis de exterminio de células espectador; no obstante, es posible que los efectos en células espectador (células malignas, células
5 endoteliales) y efectos directos sobre fibroblastos estromales tengan efecto sinérgico para conseguir las respuestas antitumorales observadas en este experimento.

Ejemplo 8

Humanización de MFP5

10 Para establecer un modelo estructural del dominio MFP5 VL se escoge una plantilla estructural del Banco de Datos de Proteínas (PDB) del Brookhaven National Laboratory. El dominio VL del anticuerpo monoclonal murino "1FOR" se escoge con 83% de identidad de secuencia/88% de similitud y una
15 resolución de 2.8 Å. Para el dominio MFP5 VH la estructura de anticuerpo monoclonal de ratón "2C1P" con 71% de identidad de secuencia y 81% de similitud se escoge como máxima plantilla de modelado. Para determinar la estructura del H-CDR3 como modelo separado, se escoge la estructura "1MAM" de anticuerpo
20 monoclonal murino para el injerto de bucle. El mejor acoplamiento para el armazón de consenso humano es del tipo Vk humano y VH3 humano, estando a disposición 15 de dichas estructuras en el PDB. Para establecer un modelo de estructura del dominio humano Vk3, se escoge la estructura de
25 anticuerpo humano "1DNO". Para modelar un dominio humano VH1 se escoge un registro PDB "1VGE" y además se utiliza la estructura de "1WT5" para modelar el terminal N y el registro "1FVC" de PDB para el bucle CDR H3. El injerto en bucle es llevado a cabo incorporando las regiones murinas MFP5 CDR en
30 armazones de anticuerpo humano y se sintetizan los siguientes constructos de cadenas humanizadas: SEQ ID NO:6: cadena pesada (hVH01); SEQ ID NO:7: cadena ligera, versión 1 (hVK03-version1); SEQ ID NO:8: cadena ligera, versión 2 (hVK03-version2).

Las regiones variables humanizadas son clonadas en vectores de expresión de inmunoglobulina (pcDNA3.1 Invitrogen, conteniendo respectivamente regiones constantes de cadena ligera kappa humana y cadena pesada IgG1 humana) y
5 cotransfectadas de manera transitoria en las combinaciones de hVH01+ hVK03-version1 y hVH01+ hVK03-version2, ambas combinaciones son expresadas de manera transitoria en el sistema de expresión libre HEK 293 (Invitrogen) y purificadas sobre columnas A de proteína.

10 Las afinidades de los anticuerpos anti-FAP humanizados obtenidos con respecto a FAP se determina por resonancia superficial plasmon (Biacore), resultando en valores KD de 30 - 40 nM. Aproximadamente 200 unidades de resonancia de anticuerpo IgG anti-ratón son inmovilizadas utilizando el
15 equipo de acoplamiento de amina en un chip biosensor CM5 en un aparato Biacore 2000 (todos los materiales de Biacore AB, Uppsala, Suecia). El MFP5 es unido al chip sensor por aplicación de una solución con 5,2 µg/ml durante 3 minutos. La asociación y disociación de recombinante humano FAP se
20 mide durante 5 minutos a concentraciones desde 3,7 - 300 nM. El tampón corriente es HBS-EP (Biacore) suplementado con 1,25% CM-Dextran (Fluka) y 0,025% de albúmina de suero bovino (Serva) con un caudal de 20 µl/min. La regeneración superficial es llevada a cabo utilizando 50 mM HCl durante 30
25 segundos. Los parámetros de afinidad son calculados utilizando el algoritmo separado de ajuste de curación del software BLAevaluation software, versión 4.1 (Biacore).

Ejemplo 9

Expresión de FAP en cánceres de tiroides

30 Se determinan los niveles de expresión mRNA de FAP α en 38 muestras de cáncer de tiroides procedentes de pacientes sin metástasis de nodos de linfa (LN-; incluyendo 3 carcinomas anaplásicos, 6 carcinomas foliculares, 2 carcinomas medulares y 37 carcinomas papilares) y 10 muestras

de cáncer de tiroides de pacientes con metástasis de nodo de linfa (LN+; incluyendo 9 carcinomas papilares y 1 cáncer anaplásico) por medio de tecnología de chip de oligonucleótido, siendo visualizados. (Como conjunto de control se utilizaron 29 muestras de tejidos de tiroides normal). La figura 6 muestra que FAP α es sobreexpresado en muestras de cáncer, es sobreexpresado de manera significativa en tumores de pacientes con metástasis de nodos de linfa.

Se generan gráficos cuadro ("Box-") y escobilla ("whisker") (con el paquete de cálculo estadístico R basado en datos de expresión de genes normalizados extraído de la base de datos BioExpressTM (Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, USA). La línea central remarcada del cuadro indica la mediana, sus límites de la izquierda y de la derecha muestran el primer y tercer cuartil de los datos. Las escobillas se extienden al punto de datos más extremo, que no es más que 1,5 veces el rango intercuartil. La colección de muestra humana ha sido descrita por el originador de la base de datos BioExpressTM. Las hidridaciones correspondientes son llevadas a cabo en chips de oligonucleótido Affymetrix HG-U133A/B (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA).

Referencias

Boulianne G. L., Hozumi N. and Shulman, M .J., (1984). Production of functional chimeric mouse/human antibody. Nature 312: 643.

Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 (1978).

Catty D. Antibodies. Oxford IR Press 1988.

Chari RVJ, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blättler WA, McKenzie SJ, Goldmacher VS. Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. Cancer Research 52: 127-31, 1992.

Chari RVJ, Derr SM, Steeves RM, Widdison WC: Dose-response of the anti-tumour effect of HUN901-DM1 against human small cell lung cancer xenografts. Proceedings of the

- American Association of Cancer Research (2000) 41, (April 1-5), Abs. 4405.
- Chothia and Lesk., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987).
- Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J, (1985).
5 J. Virol. 55, 836-839.
- Francisco et al., Blood. 2003 Aug 15;102(4):1458-65.
- Frank, et al., Methods Enzymol. 154: 221-249 (1987).
- Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis. A Practical
Approach. IRL Press, Oxford, UK (1984).
- 10 Garin-Chesa P., Old L. J., and Rettig W. J., (1990),
Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as
a potential antibody target in human epithelial cancers.
Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 7235.
- Goldmacher et al., J Immunol 135: 3648-3651, (1985).
- 15 Goidmacher et al., J Cell Biol 102: 1312-1319, (1986).
- Hayden and Mandeck. Gene synthesis by serial cloning of
oligonucleotides. DNA 7(8): 571-7 (1988).
- Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F.,
Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T. A human homologue of
20 the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in
colorectal carcinomas and adenomatous polyps. J. Cell Biol.
120: 227-233 (1993).
- Hofheinz R, Al-Batran SE, Hartmann F, Hartung G, Jäger
D, Renner C, Tanswell P, Kunz U, Amelsberg A, Kuthan H,
25 Stehle G: Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal
antibody: An early phase II trial of sibrotuzumab in patients
with metastatic colorectal cancer, Onkologie 26: 44-48,
(2003).
- Ichimura et al., J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53
30 (1991).
- Iwasaki H et al. Cancer 1992, 15: 437-447.
- Jameson, BA and Wolf, H. (1988), "The antigenic index: a
novel algorithm for predicting antigenic determinants."
Comput. Appl. Biosci. 4, 181-186.

Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203: 88-98 (1991).

Jones ST, Bendig MM: Rapid PCR-cloning of full length
5 mouse immunoglobulin variable regions, *Biotechnology* 9, 88-89, 1991).

Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th Ed.). NIH Publication No. 91-3242. U.S. Department of
10 Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Koopman, G., Heider, K.-H., Horts, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas
15 express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177: 897-904 (1993).

Kreitman R J Hansen H J, Jones A L, FitzGerald D J P, Goldenberg D M, Pastan I. *Pseudomonas* exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce
20 regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. *Cancer Res.* 53: 819-825 (1993).

Kupchan et al., *J. Med. Chem.*, 21, 31-37 (1978).

Kyte, J. and Doolittle, RF., (1982), *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

Lambert JM, Derr SM, Cook S, Braman G, Widdison W, Chari RVJ. Pharmacokinetics, in vivo stability, and toxicity of the
25 Tumour-activated prodrug, C242-DM1, a novel colorectal cancer agent. *Proceedings of the American Association of Cancer Research* (1998) 39: Abs 3550.

Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blättler WA, Chari RVJ. Eradication of large
30 colon tumour xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8618-23, (1996).

- Niedermeyer J, Enenkel B, Park J, Lenter MC, Rettig WJ, Klaus Damm, Schnapp A: Mouse Fibroblast Activation Protein. Conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease, *Eur. J. Biochem.* 254, 650-654, (1998).
- 5 Niedermeyer J, Kriz M, Hilberg F, Garin-Chesa P, Bamberger U, Lenter MC, Park J, Viertel B, Püschner H, Mauz M, Rettig WJ, Schnapp A: Targeted Disruption of Mouse Fibroblast Activation Protein. *Molecular and Cellular Biology* 20: 1089-1094, (2000).
- 10 Park J, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ: Fibroblast Activation Protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumour stromal fibroblasts. *JBC*, 274, 36505-36512, (1999).
- Rettig WR, Garin-Chesa P, Beresford R, Oettgen HF, 15 Melamed MR, Old LJ: Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: Differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells, *PNAS* 85, 3110-3114, 1988).
- Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S. (2005 Jan.). Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 5(1): 111-24.
- 20 Sasse et al., *J. Antibiot.* (Tokyo), 53, 879-85 (2000).
- Scott AW, Wiseman G, Welt S, Lee F-T, Hopkins W, Mitchell P, Adjei A, Divgi C, Larson S, Hoffman E, Tanswell P, Bette P, Amelsberg A, Rettig W: A phase I dose-escalation 25 study of BIBH1 in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein positive cancer. *Proc AM Soc Clin Oncol* 20: 258a, (2001).
- Stemmer et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, *Gene* 30 164(1): 49-53 (1995).
- Suzawa et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2175-84 (2000).
- Takeya M et al. *Lab Invest* 1995, 72:679-688.
- Tanswell P, Garin-Chesa P, Rettig WJ, Welt S, Divgi CR, Casper ES, Finn RD, Larson SM, Old LJ, Scott AM: Population

pharmacokinetics of antifibroblast activation protein monoclonal antibody F 19 in cancer patients. Br. J. Clin. Pharmacol 51: 177-180, (2001).

Urlaub et al., Cell 33: 405-412 (1983).

5 Welt S, Divgi CR, Scott AM, Garin-Chesa P, Finn RD, Graham M, Carswell EA, Cohen A, Larson SM, Old LJ, Rettig WJ: Antibody targeting in metastatic colon cancer: A phase I study of monoclonal antibody F19 against a cell-surface protein of reactive tumour stromal fibroblasts. J. Clin. Oncology 12: 1193-1203, (1994).

10 Worrell et al., Anti-Cancer Drug Design 1: 179-184 (1986).

Ye et al., Gene synthesis and expression in E. coli for pump, a human matrix metalloproteinase. Biochem Biophys Res Commun 186(1):143-9 (1992).

Yoshitake et al., Eur. J. Biochem., 101, 395-399 (1979).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

20

<120> Moléculas de anticuerpo específicas para la proteína de activación de fibroblastos e inmunoconjugados que las contienen

25

<130> 12-0251-PCT

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

30

<210> 1

<211> 149

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Asn Gly Ile Asn Trp Leu Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Thr Asn Thr Leu Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Thr Leu Thr Ala Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val
 130 135 140

Tyr Pro Leu Ala Pro
 145

5

<210> 2

<211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 2

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45
 Ser Gly Val Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 50 55 60
 Pro Lys Arg Trp Ile Phe Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105
 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
 130 135

<210> 3

<211> 466

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica que comprende fusión de
 secuencias murina y humana

10

<400> 3

Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Asn Gly Ile Asn Trp Leu Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Thr Asn Thr Leu Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Thr Leu Thr Ala Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460
 Gly Lys
 465

<210> 4

<211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica que comprende fusión de
5 secuencias murina y humana

<400> 4

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10      15

Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20          25          30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35          40          45

Ser Gly Val Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
50          55          60

Pro Lys Arg Trp Ile Phe Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
65          70          75          80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85          90          95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100         105

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115        120        125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130        135        140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145        150        155        160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165        170        175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180        185        190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195        200        205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210        215        220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225        230        235

```

<210> 5

<211> 931

<212> PRT

<213> Mus musculus

5

<400>5

Met	Asp	Ile	Cys	Arg	Ile	Arg	Ala	Arg	Met	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr	Arg
1				5					10					15	
Phe	Leu	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Glu	Ser	Ile	Ile	Leu	Gly
			20					25					30		
Ser	Gly	Glu	Ala	Lys	Pro	Gln	Ala	Pro	Glu	Leu	Arg	Ile	Phe	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Met	Asp	Ala	Glu	Leu	Gly	Gln	Lys	Val	Asp	Leu	Val	Cys	Glu	Val
	50					55					60				
Leu	Gly	Ser	Val	Ser	Gln	Gly	Cys	Ser	Trp	Leu	Phe	Gln	Asn	Ser	Ser
65					70					75					80
Ser	Lys	Leu	Pro	Gln	Pro	Thr	Phe	Val	Val	Tyr	Met	Ala	Ser	Ser	His
				85					90					95	
Asn	Lys	Ile	Thr	Trp	Asp	Glu	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Lys	Leu	Phe	Ser
			100					105					110		
Ala	Met	Arg	Asp	Thr	Asn	Asn	Lys	Tyr	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe
		115					120					125			
Ser	Lys	Glu	Asn	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Ser	Val	Ile	Ser	Asn	Ser
	130					135					140				
Val	Met	Tyr	Phe	Ser	Ser	Val	Val	Pro	Val	Leu	Gln	Lys	Val	Asn	Ser
145					150					155					160
Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Val	Leu	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	His	Pro	Thr
				165					170					175	
Gly	Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Arg	Pro	Glu	Asp	Cys	Arg	Pro	Arg	Gly	Ser
			180					185					190		
Ile	Glu	Gly	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Lys	Pro	Glu	Gly	Asn	Thr
		195					200					205			
Lys	Arg	Ala	Leu	Thr	Leu	Lys	Asp	Ile	Leu	Asn	Gly	Thr	Phe	Ser	Tyr

210	215	220
Lys 225	Thr Tyr Phe Pro Asn 230	Trp Ile Ser Glu Gln 235
Ser Glu Asp Asp 245	Asn Ile Val Phe Tyr 250	Glu Thr Arg Glu Ser 255
Tyr Ile Ile 260	Leu Ser Asn Ser Thr 265	Met Lys Ser Val Asn Ala Thr Asp 270
Tyr Gly Leu 275	Ser Pro Asp Arg Gln 280	Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr 285
Ser Lys 290	Leu Trp Arg Tyr Ser 295	Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp 300
Leu Gln Asn Gly Glu 305	Phe Val Arg Gly Tyr 310	Glu Leu Pro Arg Pro Ile 315
Gln Tyr Leu Cys 325	Trp Ser Pro Val Gly 330	Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr 335
Gln Asn Asn 340	Ile Tyr Leu Lys Gln 345	Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln 350
Ile Thr Tyr 355	Thr Gly Arg Glu Asn 360	Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp 365
Trp Val Tyr 370	Glu Glu Glu Met 375	Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp 380
Ser Pro Asp Gly Lys 385	Phe Leu Ala Tyr Val 390	Glu Phe Asn Asp Ser Asp 395
Ile Pro Ile Ile 405	Ala Tyr Ser Tyr Tyr 410	Gly Asp Gly Gln Tyr Pro Arg 415
Thr Ile Asn 420	Ile Pro Tyr Pro Lys 425	Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val 430
Arg Val Phe 435	Ile Val Asp Thr Thr 440	Tyr Pro His His Val Gly Pro Met 445
Glu Val Pro Val Pro 450	Glu Met Ile Ala Ser 455	Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser 460
Trp Leu Thr Trp Val 465	Ser Ser Glu Arg Val 470	Cys Leu Gln Trp Leu Lys 475
Arg Val Gln Asn Val 485	Ser Val Leu Ser Ile 490	Cys Asp Phe Arg Glu Asp 495

Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser
 500 505 510

Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser
 515 520 525

Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr
 530 535 540

Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile
 545 550 555 560

Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp
 565 570 575

Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg
 580 585 590

Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys
 595 600 605

Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser
 610 615 620

Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly
 625 630 635 640

Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln
 645 650 655

Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln
 660 665 670

Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe
 675 680 685

Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr
 690 695 700

Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys
 705 710 715 720

Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly
 725 730 735

Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp
 740 745 750

Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu
 755 760 765

Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp
 770 775 780
 Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser
 785 790 795 800
 Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala
 805 810 815
 Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu
 820 825 830
 Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys
 835 840 845
 Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr
 850 855 860
 Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser
 865 870 875 880
 Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala
 885 890 895
 Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile Ser Ser Gly Arg Ser Gln
 900 905 910
 Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser
 915 920 925
 Leu Ser Asp
 930

<210> 6

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ratón humanizada

10 <400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asn
 20 25 30
 Gly Ile Asn Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Thr Asn Thr Leu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Leu Thr Ala Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 107

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ratón humanizada

10

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Gly Val Asn Phe Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile Phe
 35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 8

<211>107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ratón humanizada

<400> 8

ES 2 348 556 T3

- 63 -

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

REIVINDICACIONES

1.- Molécula de anticuerpo anti FAP- α , fragmento o derivado del mismo, seleccionado entre:

a. un anticuerpo monoclonal murino definido por:

5 i. una cadena pesada variable que comprende la región de aa 20 a 136 de la secuencia SEQ ID NO: 1;

ii. una cadena ligera variable que comprende una región de aa 23 a 129 de la secuencia SEQ ID
10 NO:2 y

iii. la subclase IgG2a kappa;

b. un anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo monoclonal murino definido en a) por injerto CDR o por reconstrucción superficial;

15 c. un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal murino definido en a) por injerto CDR o por reconstrucción superficial.

2.- Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo quimérico b) está definido por:

20 i. una cadena pesada variable que comprende la región de aa 20 a 136 de la secuencia SEQ ID NO: 1;

ii. una cadena ligera variable que comprende una región de aa 23 a 129 de la secuencia SEQ ID NO:2 y

25 iii. cadenas pesada y ligera constantes que son de origen humano.

3.- Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 2, en la que dicho anticuerpo quimérico tiene la región de cadena pesada variable que comprende la región de aa 20 a 136 SEQ ID NO:1 fusionada a la región constante de la cadena
30 pesada humana SEQ ID NO:3 y la región variable de cadena ligera que comprende la región de aa 23 a 129 de la secuencia SEQ ID NO:2 fusionada a la región constante de cadena ligera humana SEQ ID NO:4.

4.- Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que reacciona tanto con el FAP- α murino como humano.

5.- Inmunoconjugado de fórmula:

5 $A(LB)_n$ (Formula (I))

en la que:

A es un anticuerpo anti-FAP- α o un fragmento o derivado del mismo, según se define en la reivindicación 4,

L es una fracción enlazadora;

10 **B** un agente citotóxico; y

n es un número decimal con $n = 1$ a 10.

6.- Inmunoconjugado, según la reivindicación 5, en el que dicha fracción enlazadora tiene capacidad de enlace químico de ser segmentado dentro de una célula.

15 7.- Inmunoconjugado, según la reivindicación 5 ó 6, en el que dicho agente citotóxico **B** es un maitansinoide.

8.- Inmunoconjugado, según la reivindicación 7, en el que el maitansinoide es DM1 ó DM4.

20 9. Inmunoconjugado, según la reivindicación 5, en el que el enlazador es seleccionado entre N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(N-malcimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC).

25 10.- Procedimiento para la producción de un inmunoconjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, cuyo procedimiento comprende las etapas:

a. introducir uno o varios grupos tiol en una molécula de anticuerpo definida en la reivindicación 1;

30 b. hacer reaccionar la molécula de anticuerpo obtenida en la etapa (a) con un maitansinoide;

c. recuperar el conjugado maitansinoide del anticuerpo resultante.

11.- Composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a

9, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12.- Composición farmacéutica, según la reivindicación 11, para su utilización en el tratamiento de cáncer.

5 13.- Composición farmacéutica para utilización según la reivindicación 12, en el que dicho cáncer es seleccionado entre: cánceres colorrectales, cánceres de pulmón de células no pequeñas, cáncer de seno, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cánceres de pulmón, cánceres invasivos de
10 vejiga, cánceres pancreáticos, cánceres metastáticos del cerebro, cánceres de tiroides, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de esófago, carcinoma de células escamosas de pulmón, carcinoma de células escamosas de piel, melanoma, adenocarcinoma de
15 seno, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de cérvix, carcinoma de células escamosas de páncreas, carcinoma de células escamosas de colon o carcinoma de células escamosas de estómago, cáncer de próstata, osteosarcoma o sarcoma de tejidos blandos y tumores benignos
20 que expresan FAP.

14.- Composición farmacéutica, según la reivindicación 11, para su utilización en el tratamiento de artritis reumatoide.

Fig. 1A

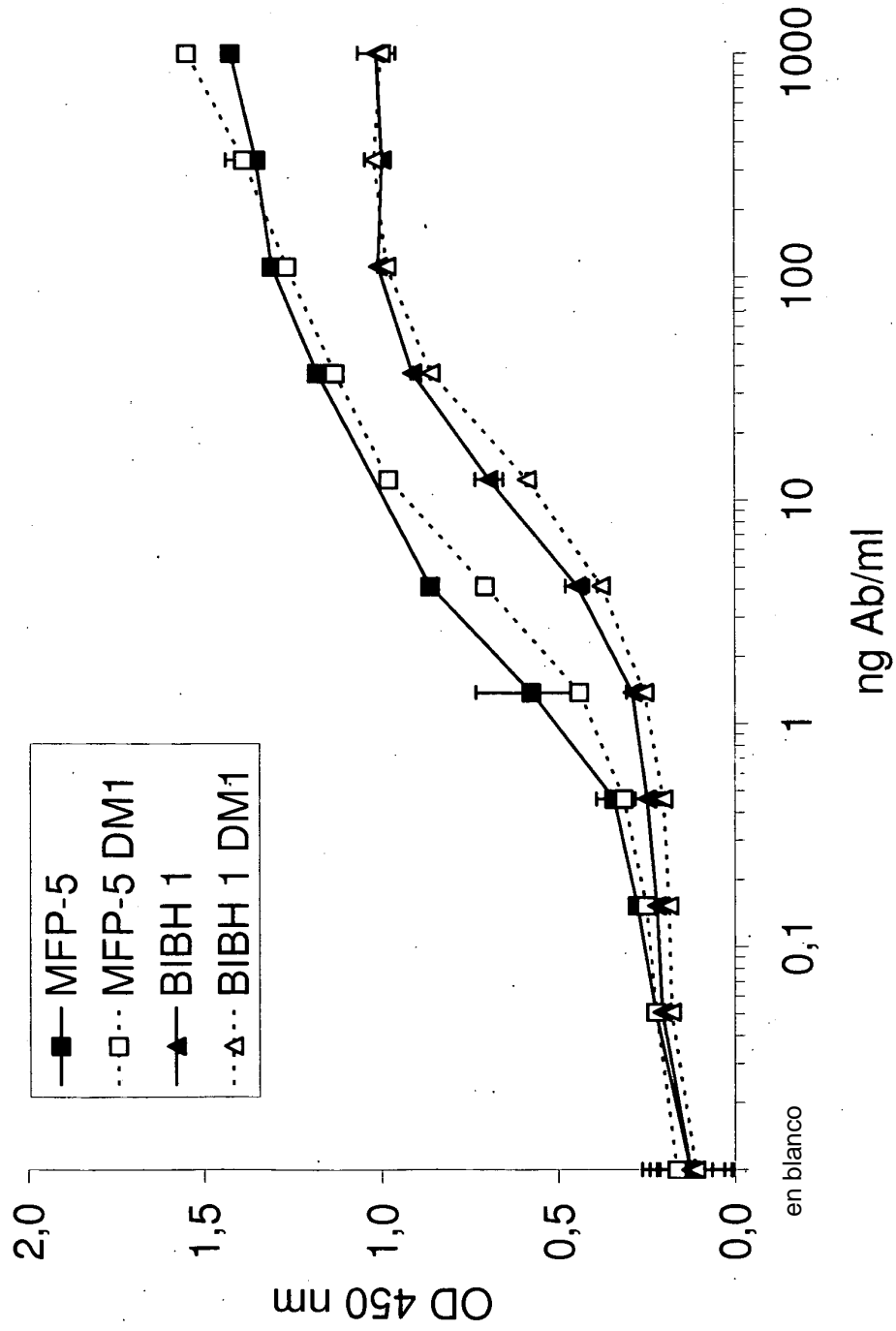


Fig. 1B

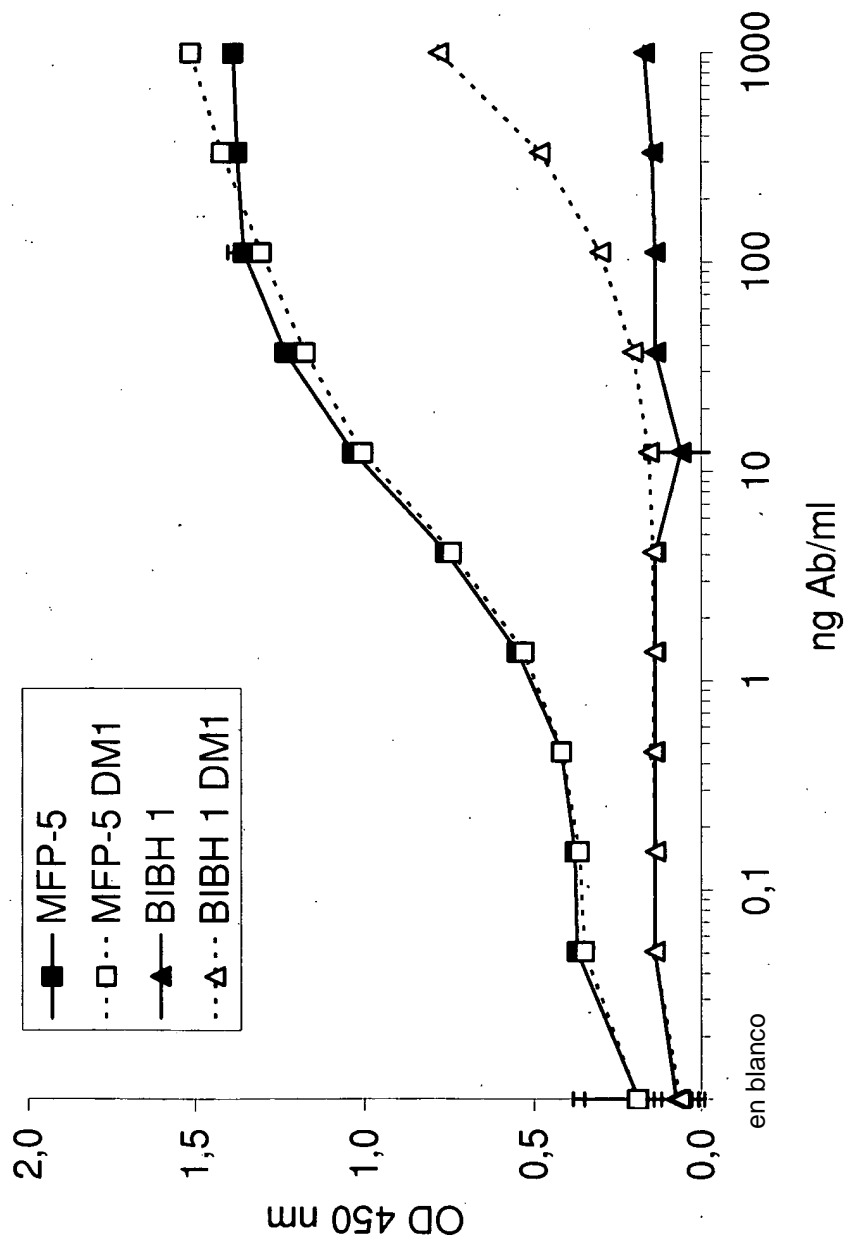


Fig. 1C

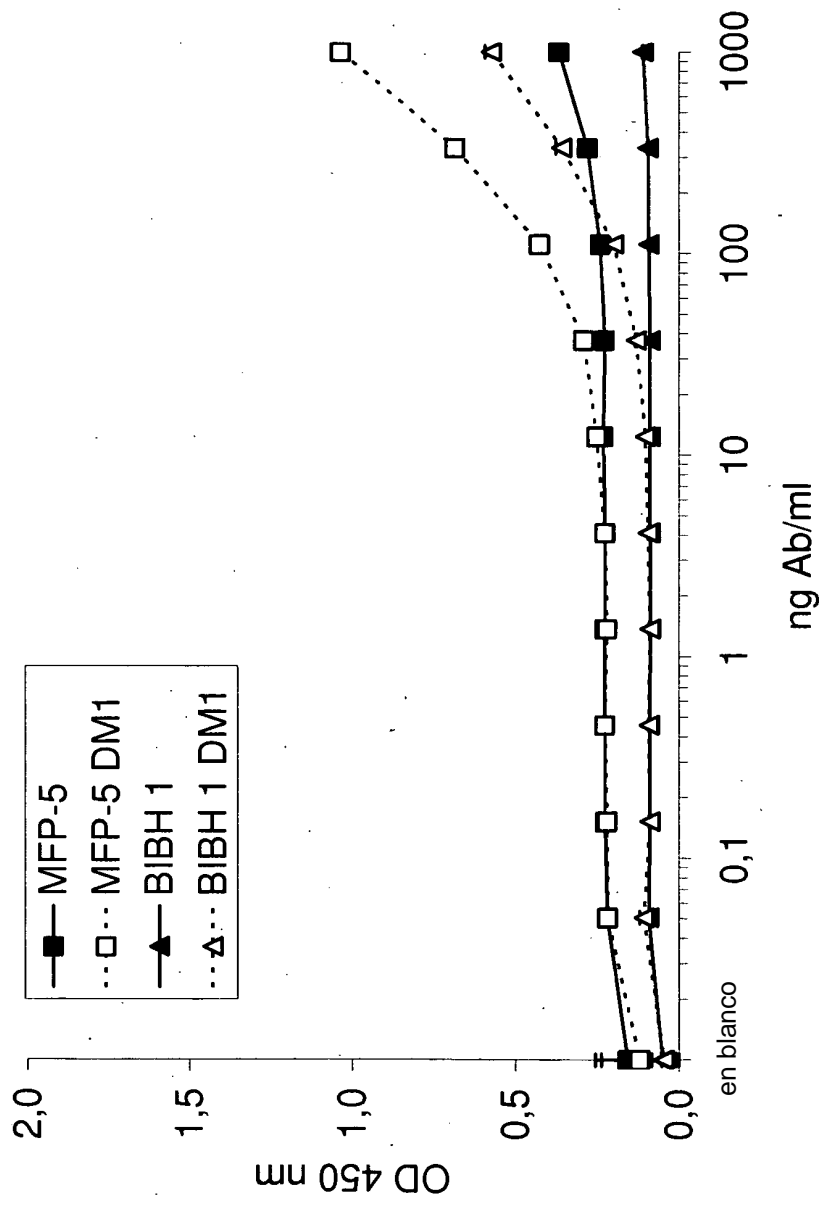


Fig. 2

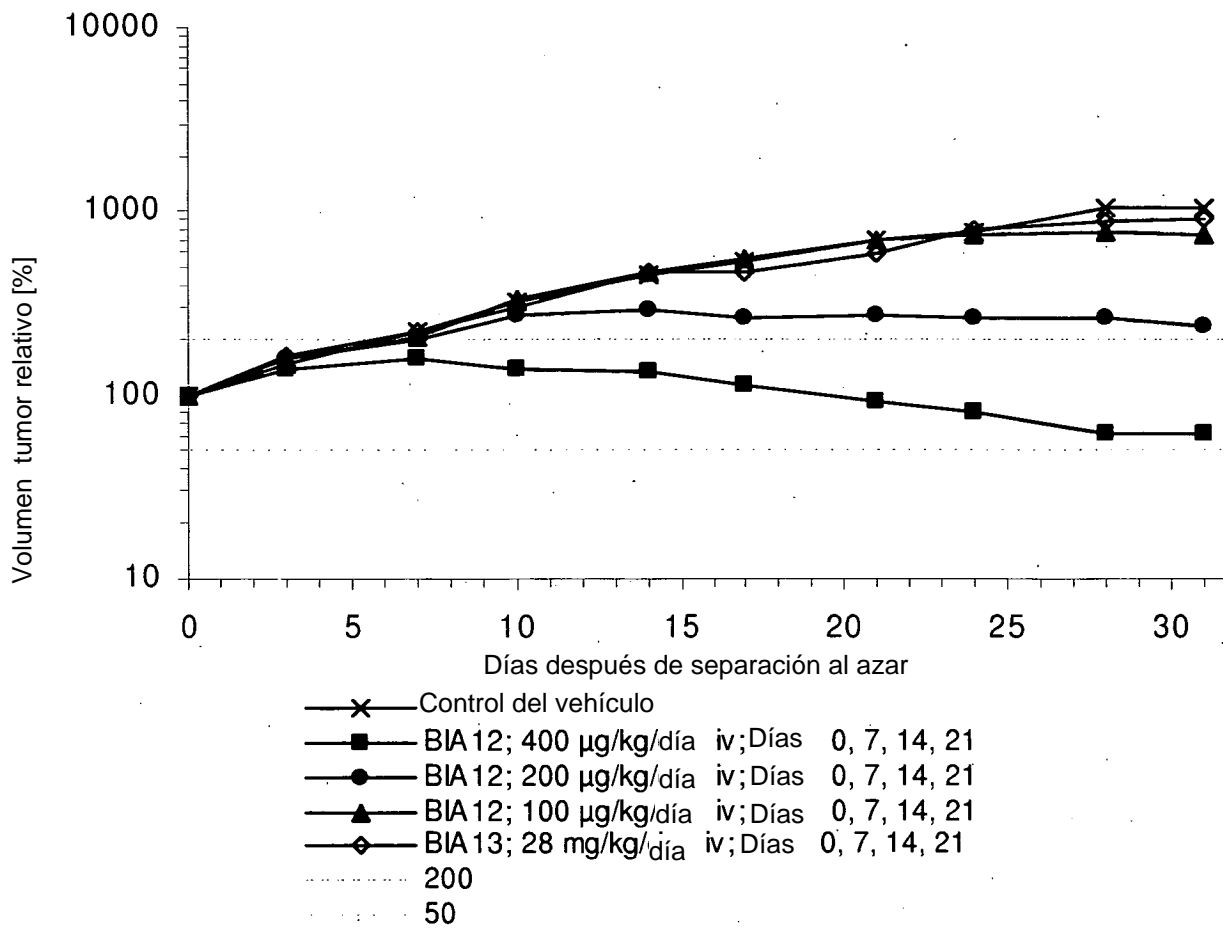


Fig. 3

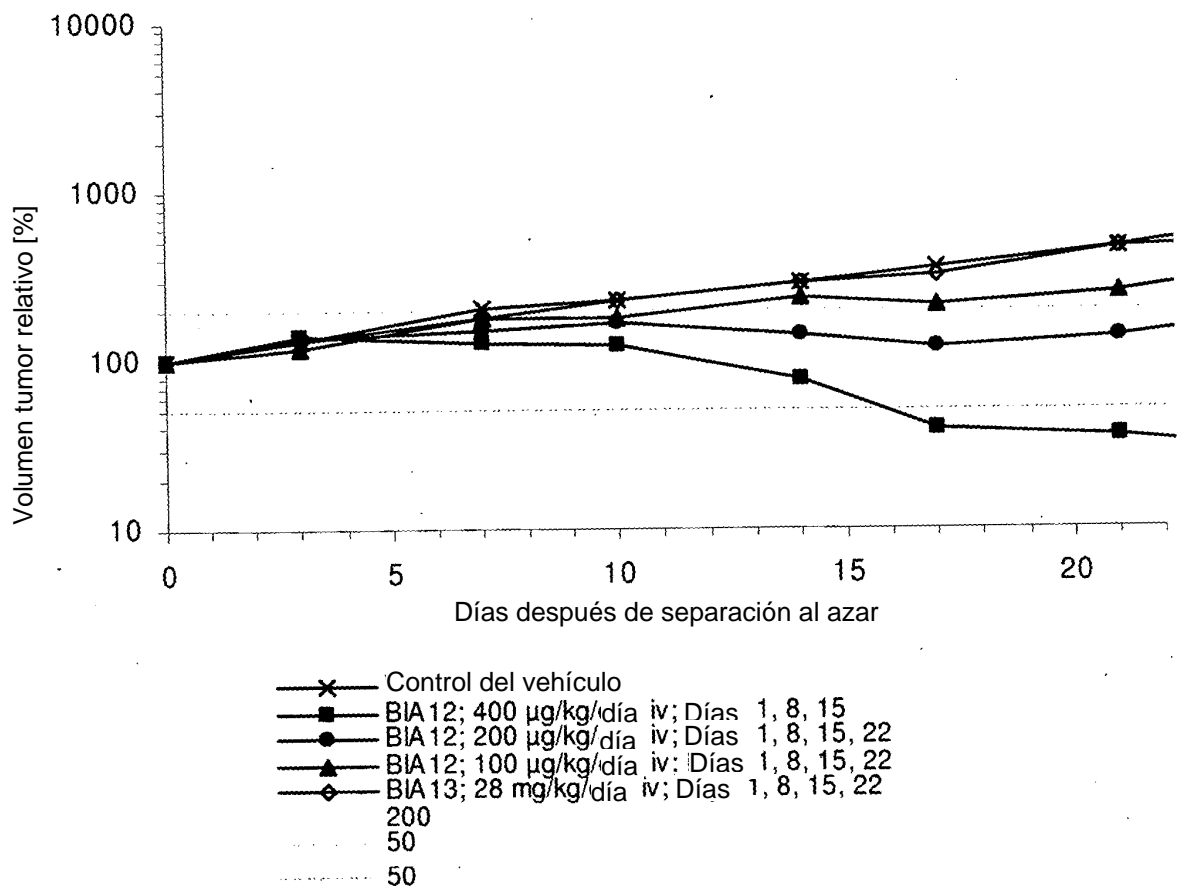


Fig. 4

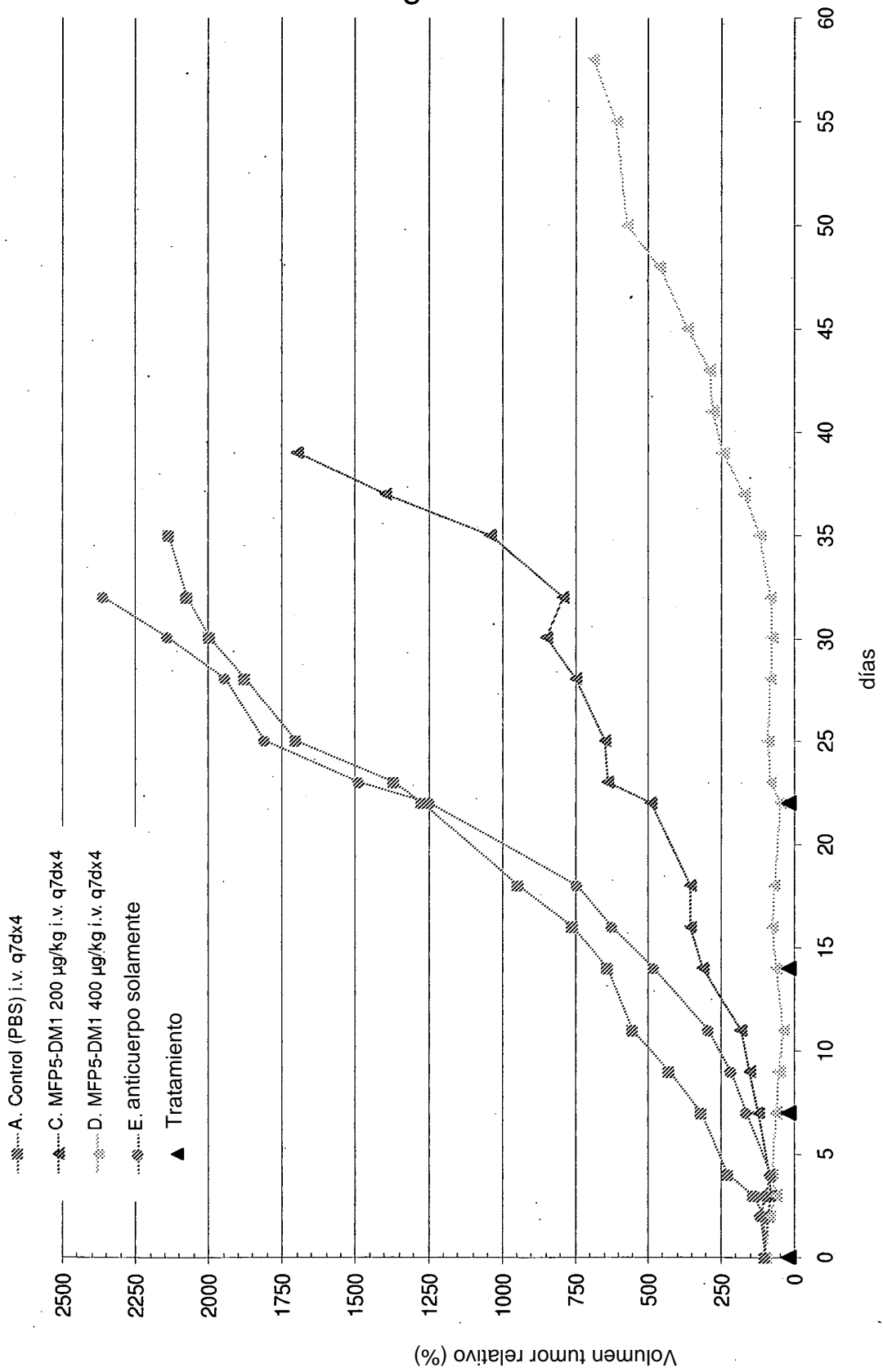


Fig. 5 A

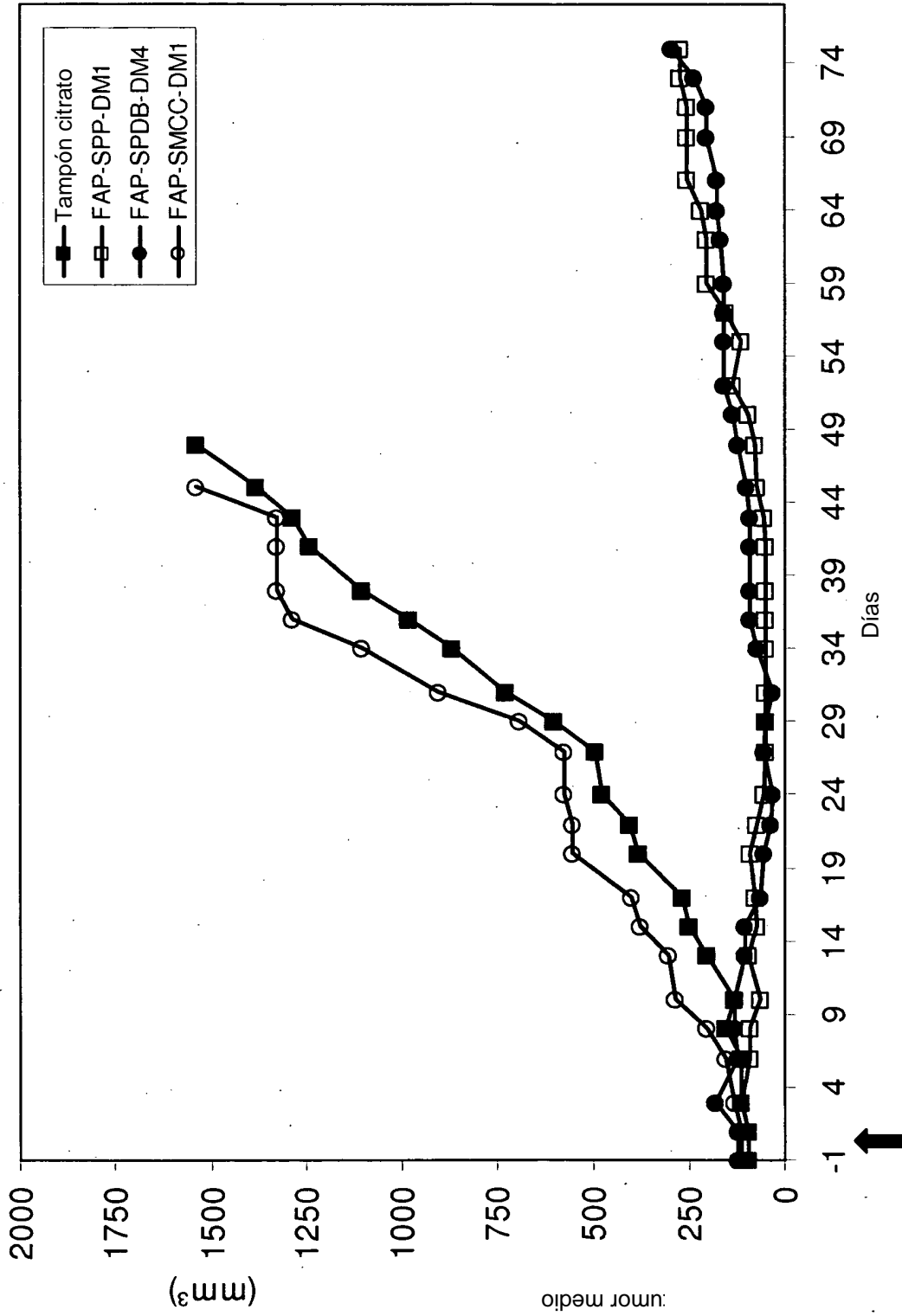


Fig. 5 B

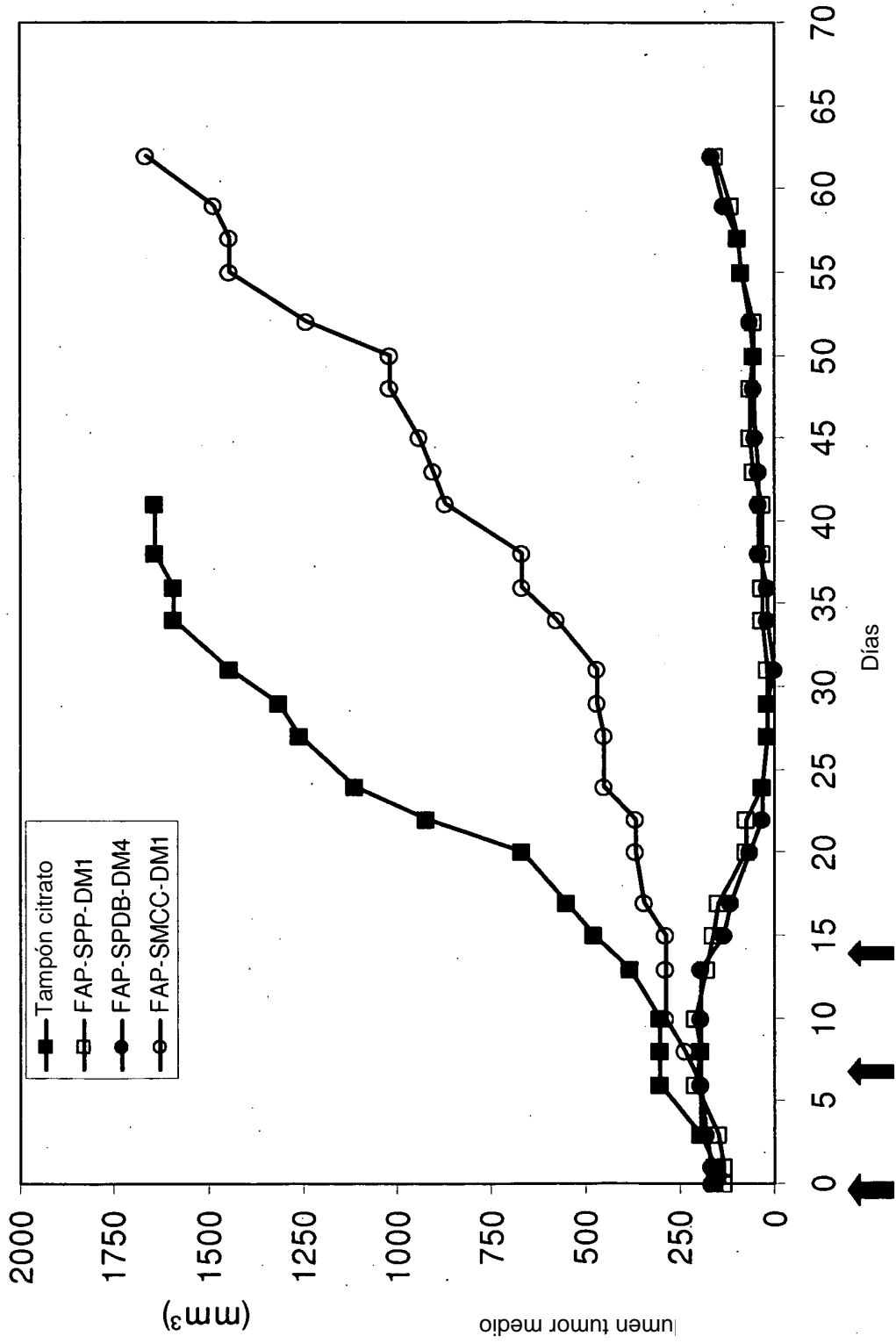


Fig. 5 C

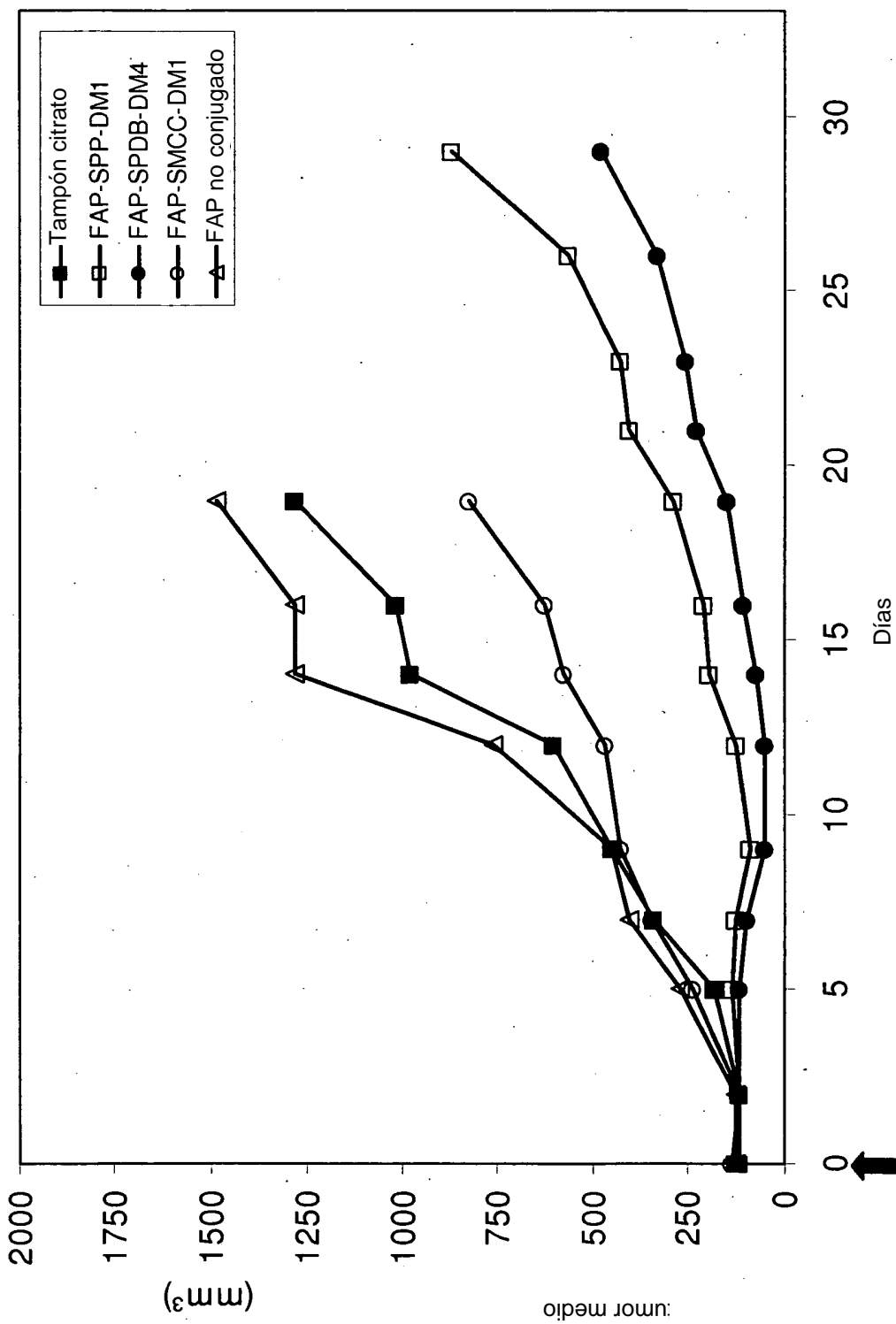


Fig. 6

