



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 770**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02748771 .9**

96 Fecha de presentación : **12.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1399186**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2004**

54 Título: **Medicamentos para el tratamiento de tumores y sus metástasis utilizando una molécula de unión contra la sialoproteína ósea.**

30 Prioridad: **13.06.2001 EP 01114388**  
**15.06.2001 DE 101 28 639**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2010**

73 Titular/es:  
**ARMBRUSTER BIOTECHNOLOGY GmbH**  
**Stubenwald-Allee 8a**  
**64625 Bensheim, DE**

72 Inventor/es: **Armbruster, Franz, Paul;**  
**Karmatschek, Markus;**  
**Nader, Werner, Franz;**  
**Forsmann, Ulf, Jorg;**  
**Paulsson, Mats y**  
**Berger, Martin, R.**

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 336 770 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Medicamentos para el tratamiento de tumores y sus metástasis utilizando una molécula de unión contra la sialoproteína ósea.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a medicamentos para el tratamiento y el combate de tumores y de metástasis que colonizan con especial frecuencia tejidos óseos.

10 **Antecedentes de la invención**

Están actualmente en desarrollo numerosos medicamentos que deben combatir tumores y sus metástasis dispersadas en huesos. A pesar de todos los avances médicos, sin embargo, las metástasis óseas no son consideradas curables y tratables. Hay intentos, mediante anticuerpos contra antígenos de superficie de células tumorales, de combatir sus metástasis. Sin embargo, a pesar de ello las metástasis óseas son en tumores de mama en el 73% de los casos y en tumores de próstata en el 68% de los casos la causa de la muerte. Para tumores de otros tejidos, son válidos los siguientes números: cuello del útero 50%, tiroides 42%, vejiga 40%, pulmón 36%, ovario 9% y colon 6%.

Las células tumorales que expresan la denominada sialoproteína ósea tienen la particularidad de que anidan preferiblemente en tejidos óseos y forman allí metástasis, especialmente en tumores de próstata, mama, pulmón, riñón y tiroides y menos frecuentemente en tumores malignos y semimalignos. La sialoproteína ósea (BSP) es una glucoproteína ósea fosforilada con una masa relativa de aprox. 80 kDa en PAGE-SDS. El ADNc de BSP codifica una secuencia peptídica de aprox. 33 kDa (Fisher L.W. y col. (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 2347-51; US 5.340.934). La BSP es una de las pocas proteínas de matriz cuya presencia está limitada a tejidos mineralizados como huesos, dentina y cartílago calcificado. La BSP representa aprox. el 10 al 15% de las proteínas no colagénicas totales en la matriz ósea. Se expresa generalmente en células que participan en la formación de dentina, hueso y cartílago, por ejemplo de osteoblastos, osteocitos emergentes, condrocitos hipertróficos, odontoblastos y cementoblastos, pero también de trofoblastos en la placenta, así como de algunos tipos de células cancerosas, por ejemplo, en tumores primarios y secundarios de pulmón, mama, próstata, riñón, tiroides y neuroblastoma, en mieloma múltiple y en metástasis óseas. El grado de expresión de la BSP por el tumor se correlaciona estrechamente con la gravedad de la enfermedad cancerosa (Waltregny D. y col., "Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers", en *J. Bone Miner. Res.*, 2000, 15(5), 834-43; Bellahcène, A. y col., "Bone sialoprotein expression in primary human breast cancer is associated with bone metastases development", en *J. Bone Miner. Res.*, 1996, 11, 665-670; Waltregny, D. y col., "Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer", en *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, 90, 1000-1008; Bellahcène, A. y col., "Expression of bone sialoprotein in primary breast cancer is associated with poor survival", en *Int. J. Cancer*, 1996, 69, 350-353).

La BSP debe causar como molécula de adhesión el anclaje y la difusión de células en la matriz de tejido, ya que *in vitro* forma núcleos de cristalización para apatita biológica e *in vivo* participa en las mineralizaciones. La desactivación del gen de BSP en ratones con inactivación génica no condujo a ninguna alteración perceptible de la formación y función esquelética. En tumores, se atribuye a la BSP la participación en la microcalcificación (Castronovo, V. y col., "Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells", en *Int. J. Oncol.*, 1998, 12, 305-308) y la colonización del hueso por células tumorales metastásicas (Bellahcène, A. y col., "Expression of bone sialoprotein in primary breast cancer is associated with poor survival", en *Int. J. Cancer*, 1996, 69, 350-353).

El valor de concentración de BSP en el suero de pacientes con carcinomas primarios sirve para el diagnóstico de si estos pacientes poseen metástasis óseas o éstas provienen probablemente del tumor primario (Tesina de la Sra. Ina-Alexandra Meier, "Sntwicklung eines Radioimmunoassays zur Bestimmung von Bonesialoprotein (BSP)", 1996, Darmstadt, Fachhochschule, FB Chemische Technologie; discurso del Sr. Markus Karmatschek, "Isolierung von Bonesialoprotein aus humanem Knochen, Aufbau eines Radioimmunoassays zu dessen Messung im Serum", 1996; FB Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt; Diel I.J. y col., "Elevated bone sialoprotein in primary breast cancer patients is a potent marker for bone metastases"; en *Proceedings of ASCO*, 1998, 17, Resúmen 461; Diel I.J. y col., "Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis", en *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5, 3914-19; DE 19.813.633; DE 19.821.533; WO 99/50666).

La BSP libre se une sin embargo con alta afinidad en fluidos corporales al factor de complemento H. Además, la BSP puede unirse a distintos receptores. Así, se han preparado anticuerpos en conejos contra distintas estructuras parciales peptídicas de la BSP (Fisher, L.W. y col., "Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins". *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 1995, 266, 61-655), contra BSP recombinante (Stubbs JT 3º y col., "Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: delineation of the mineralbinding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain". *J. Bone Miner. Res.* 1997, 12 (8), 1210-22) y contra BSP aislada de hueso, que no reconocen la BSP completa en suero humano. La gran molécula de factor H de 150 kDa enmascara supuestamente la BSP más pequeña (de aprox. 65 kDa) de modo que los anticuerpos no pueden unirse. Además, el factor H se presenta en el suero en exceso (0,5 mg de factor H/ml en comparación con BSP < 20 ng/ml de suero en personas sanas y como máximo 160 ng/ml en pacientes de tumores). Se afirma que la detección directa inmunológica de la BSP en fluidos corporales es imposible debido a la unión al factor H sin procesamiento reductor de muestra y posiblemente los trofoblastos y células tumorales productoras de BSP se protegen así del ataque

del sistema inmunitario, porque el factor H pertenece al sistema de complemento y causa coincidentemente la inhibición de la ruta alternativa a la lisis de complemento (Fedarko N. S. y col., "Factor H binding of bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack", en *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 16666- 16672; WO 00/062065). Además, la BSP puede unirse mediante la secuencia de reconocimiento propia (arginina-glicina-aspartato, RGD) específicamente a los receptores de integrina en la superficie celular. En la expresión de BSP, las células tumorales deben unirse entonces al factor H en la sangre y en los fluidos tisulares en su superficie celular o concentrarse alrededor. Dicha protección de BSP ante el sistema de complemento de la sangre de la madre se supone también para los trofoblastos en la placenta (Fedarko N. S. y col., "Factor H binding of bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack", en *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 16666-16672; WO 00/62065). Se supone además una función de la BSP en la angiogénesis. Además de la adhesión de osteoclastos y osteoblastos a la matriz ósea mediante la unión de la secuencia de reconocimiento RGD en la matriz a los receptores de integrina alfa(v)beta(3) sobre la pared celular, se observa también que la adhesión, difusión y orientación de las células endoteliales está mediada supuestamente por BSP. A saber, la formación de vasos sanguíneos alrededor de un tumor está acompañada por la expresión de BSP en las células tumorales (Bellahçène A y col., "Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis", en *Circ. Res.* 2000, 86(8), 885-91).

Estas propiedades hacen por tanto de la BSP un punto de partida para medicamentos de todo tipo. Así, la unión de BSP por la secuencia RGD a receptores de vitronectina o integrina de células tumorales y epiteliales puede inhibirse mediante antagonistas (documentos US 6.069.158; US 60.008.213; US 5.849.865; van der Pluijm y col., "Bone-sialoprotein peptides are potent inhibitors of breast cancer cell adhesion to bone *in vitro*", en *Cancer Res.*, 1996, 56, 1948-1955). El documento EP 1.084.719 A1 enseña una composición farmacéutica con BSP como sustancia activa para apoyar la reparación de tejidos óseos y conectivos dañados. El documento WO 94/13310 enseña una composición con una proteína de unión a BSP de *Staphylococcus aureus* como principio activo. El documento WO 00/36919 da a conocer elementos reguladores para el control o la supresión específicos de la expresión de BSP en células de tejidos tumorales y conectivos que promueve la calcificación. O sea, generalmente las sustancias de regulación del crecimiento celular y la migración celular son especialmente interesantes para diagnóstico y terapia. Pero hay todavía demasiados factores desconocidos que controlan el crecimiento del cáncer, al interaccionar los tumores primarios y secundarios y los órganos colonizados. Son etapas importantes en este momento la invasión, la adhesión, la migración y la división celular de las células tumorales. Además de metaloproteinasas de matriz, las moléculas de adhesión y factores quimiotácticos desempeñan aquí un papel especial. No es conocido un medicamento para combatir ni tampoco para curar metástasis óseas basado en anticuerpos contra y moléculas de unión a BSP. Tampoco es conocido que la BSP de células tumorales es distinta de la BSP de células sanas normales.

### 35 Sumario de la invención

Es objeto de la invención un medicamento definido en la reivindicación 1 para la terapia de tumores y sus metástasis, que colonizan preferiblemente tejidos óseos, que comprende como principio activo al menos una molécula de unión que se une a sialoproteína ósea o un fragmento de la misma en suero o plasma. El principio activo es preferiblemente un anticuerpo o un aptámero o Spiegelmer® (Noxxon, Berlín, Alemania) basado en ADN o ARN y que se une en un sentido amplio a una molécula que corresponde a una sialoproteína ósea modificada química o naturalmente en la glucosilación. La molécula de unión puede ser un anticuerpo o aptámero que se une específicamente a sialoproteína ósea de células tumorales, o también a la estructura de unión del receptor de BSP natural o de la molécula del factor H. La molécula de unión se une a o puede prepararse contra sialoproteína ósea modificada en la glucosilación a partir de material óseo cuyo donante no era capaz de glucosilación normal de las proteínas óseas.

En una forma de realización especialmente preferida, el medicamento contiene como principio activo un anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos contra la sialoproteína ósea humana (BSP<sub>h</sub>), en el que los anticuerpos se unen a epítopos que están presentes en sialoproteína ósea humana de células tumorales cuya glucosilación postraduccional está modificada o incompleta en el intervalo de los aminoácidos 120 a 135 (SWISSPROT: SIAL\_HUMAN, N° de acceso P21815, incl. secuencia señal), que contiene los aminoácidos TGLAA, frente a sialoproteína ósea normal de hueso. El medicamento según la invención puede contener como principio activo también un anticuerpo y/o un aptámero producido contra un epítipo de BSP<sub>h</sub>, que comprende la secuencia aminoacídica TGLAA o YTGLAA o opcionalmente grupos de azúcar así como una molécula portadora. El principio activo es preferiblemente un anticuerpo IgY de gallina. El anticuerpo IgY de gallina puede ser también un correspondiente anticuerpo humano o humanizado. Además, se prefieren medicamentos en que la molécula de unión contenga como anticuerpo biespecífico otro paratopo adicional que sea preferiblemente específico del epítipo de CD3. El principio activo puede ser también una inmunotoxina que sea un conjugado de molécula de unión y un resto con actividad citotóxica. La inmunotoxina puede ser por ejemplo un conjugado que contenga la cadena A de ricina o un fragmento no de unión de la toxina de la difteria. La molécula de unión puede estar acoplada además con un radionucleido, de modo que el medicamento pueda utilizarse también para inmunoescintigrafía o para la localización y observación de la progresión de metástasis óseas.

El medicamento según la invención puede contener adicionalmente al menos un anticuerpo, ligando o inhibidor del grupo de moléculas de adhesión, proteasas asociadas a membrana, receptores que median el quimiotactismo, receptores de quimiocina y sustancias inductoras de la apoptosis. Los inhibidores pueden elegirse de modo que bloqueen al menos parcialmente la BSP y modulen su función. El medicamento según la invención es por tanto especialmente adecuado en el campo de aplicación para el tratamiento de tumores del grupo de tumores de próstata, mama, pulmón, riñón y tiroides, enfermedades tumorales del sistema sanguíneo, del sistema linfático, del sistema cardiocirculatorio,

del sistema nervioso, del tracto respiratorio, del tracto digestivo, del sistema endocrino, de la piel incluyendo anejos, del aparato locomotor y del tracto urogenital.

Se describen ahora otros rasgos y ventajas con referencia a los ejemplos y las figuras adjuntas.

### Breve descripción de las figuras

Se muestran:

Fig. 1 una transferencia Western con isoformas específicas de tumor y de hueso de la BSP;

Fig. 2 una transferencia Western del sobrenadante de cultivo celular de células EBNA-293 no transfectadas (controles negativos) y células EBNA-293 transfectadas con los constructos de expresión GST-EK-BSP e his<sub>6</sub>-myc-EK-BSP usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BSP;

Fig. 3 la secuencia aminoacídica de la BSP secretada (SEQ ID N° 2) según Fisher y col. (1991);

Fig. 4a curva de los tamaños de lesión en milímetros cuadrados de una metástasis ósea en la tibia de la rata 988 durante el periodo de observación y terapia;

Fig. 4b radiografía 31 días después de la operación de la lesión en la tibia antes del inicio de la terapia;

Fig. 4c radiografía 52 días después de la operación de la lesión con lisis aún progresiva del hueso después del inicio de la terapia;

Fig. 4d radiografía 73 días después de la operación de la lesión regresiva;

Fig. 4e radiografía 126 días después de la operación de la lesión curada;

Fig. 4f reconstrucción por TC de la lesión 31 días después de la operación;

Fig. 4g reconstrucción por TC de la lesión regresiva 80 días después de la operación;

Fig. 5a curva de los tamaños de lesión en milímetros cuadrados de una metástasis ósea en fémur distal de la rata 987 durante el periodo de observación y terapia;

Fig. 5b radiografía 52 días después de la operación de la lesión en fémur distal;

Fig. 5c radiografía 96 días después de la operación de la lesión regresiva y la formación de callo.

### Descripción detallada de la invención

Es por tanto objeto de la invención un medicamento para la terapia de enfermedades tumorales que contiene el principio activo definido en la reivindicación 1. En una forma de realización, la molécula de unión es un anticuerpo o un aptámero basado en ARN o ADN que reconoce la BSP en presencia de factor H. Las moléculas de unión especialmente preferidas reconocen la BSP específica de células tumorales. El medicamento puede reforzarse con las siguientes sustancias: anticuerpos, ligandos o inhibidores que interaccionan con moléculas de adhesión, con proteasas asociadas a membrana o con receptores que median el quimiotactismo como, por ejemplo, los receptores de quimiocina, así como sustancias inductoras de la apoptosis como preferiblemente anticuerpos, aptámeros o proteínas/péptidos que se obtienen a partir de peptidotecas naturales o artificiales. Una interacción proteína(péptido) específica, preferiblemente con moléculas inespecíficas que se obtienen de extractos naturales, de proteínas de unión preparadas sintéticas o recombinantes, así como de otras peptidotecas-proteotecas, basta sin embargo para causar el efecto de la apoptosis de células tumorales. Según el correspondiente diagnóstico, puede emplearse una terapia específica. En este momento, se observa sorprendentemente en el empleo de anticuerpos anti-BSP o proteínas de unión un inicio acelerado de la muerte de las células tumorales (apoptosis).

Son tumores así tratables particularmente del grupo de tumores de mama, próstata, pulmón, riñón y tiroides, así como enfermedades tumorales del sistema sanguíneo, del sistema linfático, del sistema cardiocirculatorio, del sistema nervioso, del tracto respiratorio, del tracto digestivo, del sistema endocrino, de la piel incluyendo anejos, del aparato locomotor y del tracto urogenital incluyendo riñones.

La administración de las proteínas de unión y anticuerpos permite una nueva terapia de las enfermedades tumorales basadas en el sistema de BSP y el reforzamiento por inclusión de otros agrupamientos de proteoma asociados a superficies tumorales. El medicamento se basa en el uso de anticuerpos, aptámeros, ligandos o inhibidores específicos de BSP contra tumor primario o secundario y metástasis dispersantes, es decir, para la supresión del crecimiento canceroso, incluyendo la metastatización. El medicamento según la invención se basa en la comprobación de que la BSP actúa sobre células tumorales específicas de modo autocrino, paracrino y endocrino mediante la configuración específica de enfermedad del proteoma de células tumorales. Se controla en tumores primarios y determinados secundarios su

comportamiento de adhesión, migración y proliferación. Mediante la detección diagnóstica de los factores expresados y regulados elevados localmente así como la presencia de BSP, resulta la posibilidad de suprimir decisivamente o impedir completamente el crecimiento canceroso, incluyendo la metastatización tumoral.

5 Una forma de realización adicional de la invención se refiere al uso de los anticuerpos según la invención en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores y metástasis. Los anticuerpos según la invención así como sus estructuras parciales o conjugados pueden aplicarse mediante inyección o mediante supositorios y se unen a la BSP circulante libre o unida a factor H en la sangre o fluido tisular y la neutralizan. En caso de que existiera una función protectora no documentada hasta ahora del complejo de factor H frente al modo alternativo de activación por complemento, se desactiva éste y las células tumorales se hacen atacables por el sistema inmunitario. Además, se desactiva el efecto angiogénico de la BSP.

15 Para la unión al complejo de factor H y BSP, los anticuerpos deben reconocer los epítomos de BSP que no estén enmascarados por la pareja de unión. La preparación de dichos anticuerpos no era posible hasta ahora. La invención pone a disposición dichos anticuerpos porque los anticuerpos están dirigidos contra una isoforma de la sialoproteína ósea (BSP) plegada y se unen a epítomos que sólo se forman en una sialoproteína ósea plegada de células tumorales cuyas glucosilaciones en el intervalo de los aminoácidos 120 a 135 (con secuencia señal), que comprende la secuencia aminoácídica TGLAA o YTGLAA, están modificadas o incompletas o faltan frente a la sialoproteína ósea normal de hueso. Normalmente, no pueden obtenerse anticuerpos específicos contra estructuras de azúcar postraduccionales o complejas de proteínas, debido a que dichas estructuras de azúcar se unen de igual forma a muchas proteínas distintas. Correspondientemente, los anticuerpos reaccionan contra determinadas estructuras de azúcar con muchas proteínas distintas y se consideran entonces generalmente como inespecíficos y sin valor. Al contrario en la sialoproteína ósea de células tumorales. La estructura de azúcar modificada o faltante causa otro plegamiento de la sialoproteína ósea y crea nuevos epítomos en los que participan tanto aminoácidos o estructuras peptídicas como los múltiples restos de 25 azúcar restantes. Estos epítomos son sin embargo característicos de la BSP de células tumorales degeneradas.

Los anticuerpos contra estos epítomos pueden producirse con una BSP modificada química o naturalmente en la glucosilación como antígeno, y dado el caso mediante la purificación o absorción de la isoforma de BSP ósea. Preferiblemente, se preparan los anticuerpos usando BSP de células tumorales como antígeno. Después de poder 30 aislar difícilmente la BSP de células tumorales en cantidades suficientes, la expresión por ingeniería genética de la BSP modificada en la glucosilación en células tumorales es el procedimiento de elección. Se ha encontrado también que algunos pacientes contienen la BSP modificada en la glucosilación en material óseo. Es decir, estos pacientes mayoritariamente muy ancianos y aquejados de osteoporosis grave producían una BSP que al menos en parte no estaba glucosilada normalmente. También esta BSP es adecuada en principio para la obtención de los anticuerpos según la invención. El aislamiento de la isoforma parcialmente glucosilada que es igual a la isoforma tumoral de la BSP, puede realizarse análogamente a procedimientos descritos (Karmatschek M. y col., "Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologous radioimmunoassay", en *Clin. Chem.* 1997, 43(11), 2076-82).

40 Los anticuerpos pueden prepararse en ratón, conejillos de Indias, conejos, perros, cabras, cerdos, seres humanos, asnos o caballos, pero también en todos los mamíferos. Se prefiere especialmente la inmunización de aves, particularmente gallina, ya que pueden obtenerse con especial facilidad anticuerpos contra la isoforma tumoral de BSP a causa de las grandes diferencias en la historia evolutiva. Además, la presencia de anticuerpos IgY no conduce a una activación del sistema de complemento, lo que a causa de la posible unión entre factor H y BSP puede ser problemático. Los anticuerpos según la invención reconocen la isoforma tumoral de BSP en la unión con factor H.

55 Son por tanto objeto de la invención isoformas de BSP, anticuerpos específicos contra las isoformas formadas en tumores y su utilización para terapia de anticuerpos o también para inmunoescintografía. Como efectos secundarios causados por anticuerpos anti-BSP se tienen en cuenta: daños directos e indirectos de hueso y dentina por la activación del sistema inmunitario contra la matriz ósea y las células óseas y/o la destrucción directa por el uso de conjugados de anticuerpos con venenos celulares o radioisótopos. Además, es impensable una inmunoescintografía con anticuerpos anti-BSP que se unen a la matriz ósea. La matriz se marcaría radiactivamente y la localización de los tumores sería imposible. Los anticuerpos específicos de BSP tumoral son adecuados de modo especial para una terapia y localización tumorales, ya que no se unen o sólo en poca extensión a la matriz ósea o a las células productoras de BSP del esqueleto y de la dentina.

60 En una aplicación especialmente preferida de la invención, se utilizan anticuerpos para terapia tumoral que son específicos de BSP tumoral y reconocen adicionalmente la BSP en complejo con factor H. Dichos anticuerpos se suministran por la invención. Tras la aplicación de dichos anticuerpos específicos en pacientes de tumores, se marca en la sangre y el fluido tisular la BSP tumoral presente libre y unida al factor H y por tanto se eleva la protección contra la activación del complemento. Por tanto, se marcan las células tumorales específicamente para destrucción por el sistema inmunitario (por ejemplo, mediante activación clásica de la cascada de complemento) y se evitan los efectos secundarios como, por ejemplo, por activación del sistema inmunitario frente a la matriz ósea o la dentina.

65 Para la terapia tumoral e inmunoescintografía posibilitadas por la invención pueden usarse, por ejemplo, anticuerpos policlonales que pueden prepararse mediante inmunización de gallinas con BSP recombinante o de BSP modificada en la glucosilación aislada en hueso. Los anticuerpos se aíslan entonces de modo conocido de la yema del huevo y se purifican mediante cromatografía de afinidad.

## ES 2 336 770 T3

En otra aplicación de la invención, se aíslan anticuerpos policlonales humanos anti-BSP del huevo de gallinas transgénicas con el sistema inmunitario humanizado.

5 Son igualmente adecuados anticuerpos monoclonales de ratón o de gallina que satisfagan las condiciones anteriormente descritas y puedan obtenerse mediante una selección. En una aplicación especial de la patente, se usan para ello las líneas celulares monoclonales descritas en los ejemplos. Además, son adecuados fragmentos de anticuerpos como, por ejemplo, fragmentos Fab proteolíticos u obtenidos por ingeniería genética.

10 Para terapia tumoral, son adecuados además los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anteriormente descritos en conjugación con venenos celulares y radioisótopos para la destrucción directa de células tumorales después de la unión de BSP a la superficie celular.

15 Son especialmente adecuados anticuerpos policlonales y monoclonales humanizados que reconocen la BSP en complejo con factor H y no se unen a BSP en la matriz ósea. En el uso de anticuerpos de ratón y de gallina, ha de esperarse ciertamente un efecto terapéutico especial por la formación de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) o anti-gallina (HACA). Los HAMA y HACA pueden inducir y reforzar una respuesta inmunitaria del organismo sobre el antígeno tumoral. En la determinación de los marcadores tumorales, se generan sin embargo interferencias con los HAMA y HACA que perturban el procedimiento de medida *in vitro*. De este modo, aparecen altos valores de medida falsos para los marcadores tumorales. Esto sucede después de inmunoescintigrafía o inmunoterapia con los correspondientes anticuerpos, de modo que puede realizarse una determinación correcta de los marcadores tumorales sólo después de la absorción de los HAMA o HACA *in vitro*.

25 Estos efectos pueden desactivarse mediante el uso de anticuerpos humanizados. Los anticuerpos policlonales humanizados anti-BSP pueden obtenerse, por ejemplo, mediante inmunización de gallinas transgénicas con BSP en las que se ha intercambiado en las células madre embrionarias la zona del gen de la parte Fe de la inmunoglobulina (IgY) específica de gallina por una específica humana (documentos US 5.340.740; US 5.656.479). Los anticuerpos humanizados se depositan entonces en los huevos de gallina y pueden aislarse de la yema de huevo (Mohammed S. M. y col., "Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens". *Immunotechnology*, 1998, 4: 115-125).

30 Para la preparación de anticuerpos monoclonales humanizados, pueden obtenerse células de hibridoma de ratón o de gallina con anticuerpos anti-BSP adecuados según procedimientos estándar y desarrollarse anticuerpos humanizados a partir de material genético contenido en estas células mediante recombinación (documentos US 5.585.089; US 5.565.332; US 5.225.539; US 5.693.761; US 5.585.089; US 5.530.101).

35 La BSP puede utilizarse con la secuencia completa SEQ ID N° 1 y la secuencia parcial ID N° 2 en su totalidad o con sus epítomos específicos para generar anticuerpos.

40 Son fragmentos de BSP preferidos para la preparación de anticuerpos específicos:

SEQ ID N° 1:

X-YTGLAAIQLPKKAGD-Z,

45 SEQ ID N° 2:

X-FSMKNLHRRVKIEDSEENGVFKYRPRYYLYKHAYFYPHLKRFPVQSSSDSSEENGD

DSSEEEEEETSNEGENNEESNEDEDESEAENTTLSATTLGYGEDATPGTGYTGLA

50 AIQLPKKAGDITNKATKEKESDEEEEEEEGNENESEAEVDENEQGINGTSTNST

EAENGNSSGVDNGEEGEESVTGANAEGTTETGGQGKGTSKTTTSPNGGFEPPTP

PQVYRTTSPFGKTTTVEYEGEYTYDNGYEIYSENGEPRGDNRYAYEGEYSYF

55 KGQGYDGYDGQNYHHQ-Z

60 en las que la T marcada no está glucosilada o lo está incompletamente o en otra forma y X y Z representan un resto aminoacídico o peptídico de hasta 30 aminoácidos. En la SEQ ID N° 2, pueden presentarse las siguientes variaciones: en la posición 179 Gly → Val; en la posición 252 Val → Ala; en la posición 254 Glu → Asp; en la posición 279 Asp → Gly.

65 Para la preparación de anticuerpos, se acoplan los péptidos que normalmente son no inmunogénicos a la proteína portadora KLH (hemocianina de lapa bocallave). Este acoplamiento puede realizarse mediante NBS (éster N-hidroxisuccinimida de N-maleimidobenzilo) por una cisteína añadida terminal al péptido o directamente mediante carbodiimida.

## ES 2 336 770 T3

Los anticuerpos se obtienen con procedimientos convencionales mediante inmunización preferiblemente de gallinas, conejos, ratones, conejillos de Indias, etc. Pueden utilizarse también procedimientos de biología molecular como la preparación recombinante de los anticuerpos. Los anticuerpos se coprocesan entonces para purificación y galénicamente. Pueden utilizarse también preparaciones celulares, extractos celulares así como particularmente aislamientos de membrana de células que expresan BSP transfectadas artificialmente de forma sobreexpresada para la generación de anticuerpos específicos.

Los medicamentos según la invención pueden administrarse en formas de aplicación galénicas adecuadas, particularmente en forma liofilizada, incorporada con manita o azúcares similares a ampollas estériles para disolución en disolución de sal común fisiológica y/o disolución de infusión para inyección individual repetida y/o infusión continua en cantidades de 300 mg a 30 mg de anticuerpo puro o ligandos de BSP por unidad terapéutica. Preferiblemente, se administra el medicamento según la invención en una forma de aplicación galénica en la que el medicamento se utiliza en microesferas biocompatibles y por vía sistémica o local mediante aerosol, aplicación intravenosa o subcutánea.

Es comprobable con distintos procedimientos rutinarios que las células tumorales reaccionan de forma antiapoptótica, adhesiva, mitótica y quimiotáctica con la toma de agonistas que se unen a las correspondientes moléculas de proteoma. Se causa la inhibición de su obtención, adhesión, mitosis o migración mediante incubación previa con antagonistas o anticuerpos.

Con el uso de anticuerpos altamente purificados contra BSP en cultivos celulares de líneas celulares tumorales que expresan BSP, pudo comprobarse que éstos son capaces en modelos *in vitro* de causar la apoptosis de células tumorales. Si se cultivan líneas celulares o células tumorales extraídas con el uso de procedimientos de cultivo celular habituales, se reduce en gran medida su tiempo supervivencia *in vitro* por la adición de anticuerpos de BSP cuando se había detectado BSP en sus correspondientes superficies celulares. A este respecto, se observa la apoptosis de un gran número de estas células cultivadas. También en modelos *in vivo*, puede comprobarse sorprendentemente una reducción de las células tumorales por apoptosis.

Además, en ensayos en cultivo celular de células tumorales que expresan BSP, el empleo de anticuerpos específicos de BSP puede inducir la lisis celular mediada por complemento así como la lisis tumoral mediada por célula.

Ya que los ratones desnudos o ratas desnudas poseen un sistema inmunitario deficiente, puede investigarse el comportamiento de metastatización en un cuerpo hospedador en un modelo de ratón/rata desnudo sin que tenga lugar la conocida reacción inmunitaria entre especies ni se realice un rechazo de las células extrañas. Se inocularon los ratones desnudos de modo conocido con células tumorales o líneas celulares tumorales cuya expresión de BSP se había determinado y se ensayó la metastatización por estas células en el tratamiento con anticuerpos de BSP y en el tratamiento con ligandos de BSP. A este respecto, resulta sorprendentemente que en los tumores positivos de BSP encontrados se inhibe o impide claramente la formación de metástasis, porque la toma de anticuerpos conduce a una modulación del crecimiento tumoral. Sorprendentemente, resulta igualmente que los preparados analizados mediante inmunohistoquímica muestran una distribución específica de BSP y otros agrupamientos de proteoma asociados a la superficie tumoral en tumor y tejidos circundantes de tumor. Por tanto, se identifican otras posibilidades de intervención selectiva.

Resulta la ampliación de la preparación terapéutica, particularmente emplear aditivamente antagonistas dirigidos contra otros agrupamientos del proteoma de superficie de célula tumoral. Puede conseguirse un reforzamiento de este efecto especialmente mediante la combinación de anticuerpos de BSP con anticuerpos, ligandos o inhibidores que interaccionen con (i) moléculas de adhesión, (2) proteasas asociadas a membrana o (3) receptores que medien el quimotactismo como, por ejemplo, receptores de quimiocina, así como (4) sustancias inductoras de la apoptosis como, preferiblemente, anticuerpos o proteínas/péptidos que puedan obtenerse a partir de peptidotecas naturales o artificiales.

Para confirmar estos hallazgos, pueden transfectarse también establemente líneas de células tumorales con BSP. Después de la inyección de estas células (en las que BSP está sobreexpresada) en animales, colonizan dichas células tumorales preferiblemente la matriz ósea. Dichas células modificadas forman por tanto particularmente metástasis en tejido óseo mediante las cuales el principio terapéutico es igualmente detectable.

La invención se ilustra con detalle a continuación mediante los ejemplos.

### Ejemplo 1

#### *Caracterización de isoformas de BSP específicas de tumor y hueso en transferencia Western*

Se separaron los sobrenadantes exentos de suero de líneas celulares de osteosarcoma humano UMR-108, MHH-ES1 y de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (positiva de receptor de estrógeno) así como BSP humana purificada a partir de hueso (K-BSP) mediante PAGE-SDS sobre gel al 10% en condiciones reductoras y desnaturizantes y se transfirieron electroforáticamente a nitrocelulosa. Se incubó la membrana con anticuerpo monoclonal de ratón. Se realizó la detección de la BSP mediante un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado con peroxidasa y detección de quimioluminiscencia en una película de rayos X. Se representa el resultado en la Fig 1. Se dan los pesos moleculares y recorridos de los marcadores en el lado izquierdo. Las puntas de flecha individuales y dobles muestran el distinto comportamiento de migración de la BSP ósea/de osteosarcoma y la MCF-7-BSP. Esta última contiene adicionalmente

una banda de alto peso molecular (triple punta de flecha) que en las otras trazas está ausente. La BSP de una línea celular tumoral presenta por tanto un peso molecular claramente mayor que la BSP ósea y de líneas celulares de osteosarcoma, observándose además una segunda isoforma de peso molecular aún mayor.

5 Ejemplo 2

*Preparación de anticuerpos policlonales mediante inmunización de gallinas con BSP ósea y estructuras parciales pépticas de BSP*

10 Se inmunizaron gallinas y conejos con BSP que se había aislado de pacientes según el procedimiento descrito por Karmatschek y col. (1997).

15 Se aislaron de las yemas de huevo y los sueros inmunoglobulinas policlonales y en un procedimiento ELISA se ensayó la unión de BSP frente a distintas estructuras parciales peptídicas. La Tabla 1 muestra los resultados de esta cartografía epitópica. A este respecto, se sintetizaron químicamente estructuras parciales peptídicas a partir de la secuencia peptídica de preproBSP (incluyendo secuencias líder) de 317 aminoácidos de largo en total, se unieron a una placa de microvaloración y se incubaron los anticuerpos sobre la placa. Se realizó el ensayo de unión después de incubación con un conjugado de peroxidasa con inmunoglobulinas anti-IgY o anti-IgG de conejo y posterior reacción enzimática con reacción de un cromógeno como sustrato.

TABLA 1

25

<i>Cartografía epitópica de las IgG e IgY anti-BSP obtenidas</i>			
Situación de la estructura	Secuencia aminoacídica	Intensidad de la reacción	
<i>Cartografía epitópica de las IgG e IgY anti-BSP obtenidas</i>			
parcial peptídica en la BSP		ELISA	
(posición incl. líder)		IgY	IgG de conejo
45 112-123	LeuGlyTyrGlyGluAspAlaThrProGlyThrGly	-	?
216-227	GluThrGlyGlyGlnGlyLysGlyThrSerLysThr	-	?
300-311	PheLysGlyGlnGlyTyrAspGlyTyrAspGlyGln	-	?
50 130-144	IleGlnLeuProLysLysAlaGlyAspIleThrAsnLysAlaThr	+/-	+
124-138	TyrThrGlyLeuAlaAlaIleGlnLeuProLysLysAlaGlyAsp	-	++
55 137-151	GlyAspIleThrAsnLysAlaThrLysGluLysGluLysGlu-SerAspGlu	-	+
280-317	SerGluAsnGlyGluProArgGlyAspAsnTyrArgAlaTyr-GluAspGluTyrSerTyrPheLysGlyGlnGlyTyrAspGly-TyrAspGlyGlnAsnTyrTyrHisHisGln	++	+
60 BSP ósea humana		+++	+++

65

Los resultados muestran que los anticuerpos de gallina obtenidos se unen preferiblemente a la secuencia C-terminal de BSP, mientras que los anticuerpos de conejo se unen por un amplio intervalo.

## ES 2 336 770 T3

Además, se obtuvieron anticuerpos policlonales (A0001) mediante inmunización de conejos con la estructura parcial peptídica TyrThrGlyLeuAlaAlalleGlnLeuProLysLysAlaGlyAsp (posición 124-138) de BSP que reaccionan preferiblemente con esta estructura parcial peptídica, pero también específicamente con BSP ósea humana.

5 Sin embargo, los anticuerpos policlonales (AK\_tBSP) que se obtuvieron mediante inmunización de conejos con las estructuras parciales peptídicas ThrGlyLeuAlaAla (posición 125-130), por ejemplo TyrThrGlyLeuAlaAla (posición 124 a 130), es decir, después de acoplamiento con tireoglobulina bovina como portador, reaccionaban ciertamente con la estructura parcial peptídica sintética, pero no con la BSP ósea humana. Estos anticuerpos reconocen sorprendentemente exclusivamente BSP de células tumorales.

10 Para los ensayos, se usaron además los anticuerpos policlonales A002 (obtenido de L. W. Fisher) y A003 (obtenido del Dr. van Ryden). Estos anticuerpos se obtuvieron después de inmunización con las estructuras parciales peptídicas TyrGluSerGluAsnGlyGluPro**ArgGlyAsp**AsnTyrArgAlaTyrGluAsp (A002) o LeuLysArgPheProValGlnGlyGly. El primer péptido procede del extremo C de BSP (posición 278-295) y contiene la secuencia de reconocimiento RGD  
15 (**ArgGlyAsp**) de BSP para receptores de tipo integrina. El último péptido procede del extremo N de la estructura primaria de BSP. También estos péptidos reconocieron preferiblemente las estructuras parciales respectivas y reaccionaron específicamente con BSP ósea humana.

### Ejemplo 3

20 *Obtención de BSP recombinante a partir de células de cáncer de mama como antígeno*

Se amplificó a partir del plásmido B6-5g (Fisher L. W. y col., "Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localisation", en *J. Biol. Chem.*, 1990, 265(4), 2347-51) el ADNc completo de BSP humana (sin péptido señal) mediante PCR y se clonó en el vector de expresión eucariótico episómico pCEP-Pu (Kohfeldt E y col., "Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican", en *FEBS Lett.* 1997, 414(3), 557-61). Los cebadores fueron los siguientes:

Nhe I BSP (codificante)

30 5'-GCCCGCTAGCCTTCTCAATGAAAAATTTGCATCG-3'

Not I BSP (no codificante):

35 5'-CAATGACTGCGGCCGCTCACTGGTGGTGGTAGTAATTC-3'

Los sitios de corte Nhe I y Not I insertados con los cebadores eran necesarios para la clonación en el vector de expresión PCEP-PU. Este vector está equipado además en el extremo 5' del sitio de clonación múltiple con distintos marcadores para facilitar la purificación de proteína (por ejemplo, His, Myc, G8T). Estos marcadores pueden escindirse después de la purificación de la proteína con una proteasa (por ejemplo, factor X o enterocinasa). Se comprobó el cumplimiento del marco de lectura correcto mediante secuenciación.

45 Se insertaron los constructos de expresión mediante transfección estable mediada por liposomas (FUGENE™-reactivo de transfección de la compañía Roche) entre otras en las siguientes líneas celulares humanas:

- la línea celular renal embrionaria EBNA-293,
- 50 • las líneas celulares de osteosarcoma SAOS-2 y MG-63
- la línea celular de cáncer de mama humana MCF-7.

Se obtuvo la expresión recombinante sólo en células MCF-7 y EBNA-293 (véase la figura 2). Las líneas celulares de osteosarcoma no se expresan tampoco después de ensayos de transfección repetidos.

### Ejemplo 4

*Análisis de la glucosilación de BSP recombinante de células degeneradas y BSP ósea*

60 Se cultivaron células transitorias durante 48 horas después de transfección de dos días en medio exento de suero. Puesto que las proteínas en FCS no dificultaban la purificación de la BSP recombinante, se cultivaron células que expresaban BSP después de alcanzar la confluencia en condiciones exentas de suero. En estas condiciones, sólo pudieron sobrevivir las células EBNA-293 más de 2 a 4 horas. Se controló la expresión de la BSP recombinante mediante  
65 PAGE-SDS e inmunotransferencia.

El análisis de sobrenadantes de cultivo celular exentos de suero resultó con todas estas líneas celulares en señales positivas en transferencia Western tanto con respecto a la BSP como a la presencia de los distintos marcadores.

## ES 2 336 770 T3

Se purificaron 2,5 l de sobrenadante de cultivo exento de suero de la línea celular MCF-7 transfectada por una columna de Sepharose™ y se obtuvieron de ella 250 µg de His-myc-EK-BSP homogénea. El producto de expresión así purificado estaba parcialmente glucosilado, pero no poseía glucosilación en la treonina 125, es decir, la treonina en la secuencia de BSP YT<sup>125</sup>LPAA.

Para el análisis de azúcares, se separaron los N-glucanos de la BSP recombinante (BSPr) o de la BSP ósea enzimáticamente con el péptido N-glucosidasa F (PNGasa F, Roche). La enzima causa una escisión catalítica de todos los tipos de N-glucano de las asparaginas. Para la digestión, se precipitaron 20 a 200 µg de BSP con etanol y se incubó el residuo de precipitación en SDS al 1%, β-mercaptoetanol, EDTA 0,1 M durante 30 minutos a temperatura ambiente con un exceso de enzima. Siguió una digestión con N-glucosidasa F durante una noche a 37°C. Para el desalado de la disolución de N-glucano, se circuló la digestión por una columna de carbono de 150 mg (Carbograph SPE, Alltech) y se eluyó el N-glucano con ACN al 25% en 0,05% de TFA.

Se escindió el O-glucano de la BSP mediante hidrazinólisis anhidra con un kit (Oglycan release kit, Glyco). Para ello, se liofilizaron aproximadamente 200 µg de BSP exenta de sal durante 24 horas, se mezclaron con atmósfera de gas protector de argón con 50 µl de reactivo de hidrazina, se disolvieron y se incubaron durante 5 horas a 60°C. Se retiró la hidrazina a vacío. Siguió una re-N-acetilación de los grupos N-acetilo con anhídrido acético.

Se marcaron los N- y O-glucanos con el colorante fluorescente 2-aminobenzamida (Fluka) y se digirieron los oligosacáridos marcados con 2-AB secuencialmente con glucosidasas terminales específicas y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

### *Discusión del análisis*

La secuencia aminoacídica de BSP humana contiene cuatro sitios de N-glucosilación potenciales en las posiciones 88 (NTT), 161 (NGT), 166 (NST) y 174 (NGS). Para la O-glucosilación, no es conocida ninguna secuencia consenso comparable. Todas las estructuras de N-glucano identificadas se encontraban tanto en la BSP aislada de hueso como en la BSP recombinante de EBNA-293. Sin embargo, había diferencias en la proporción porcentual de las estructuras respectivas en los N-glucanos totales. Así, la proporción principal de BSP-N-glucanos en hueso consistía en estructuras trirramificadas (58%) y en la línea celular EBNA en estructuras tetrarramificadas (48%).

Para la localización de los sitios de O-glucosilación de la BSP recombinante, se eliminaron los O-glucanos mediante digestión secuencial de la proteína con neuraminidasa, β-galactosidasa y β-N-acetilhexosaminidasa hasta el núcleo de GalNAc. Se escindió entonces en fragmentos peptídicos la proteína parcialmente desglucosilada mediante tratamiento con tripsina y proteasa V8. Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, se determinaron las masas de los péptidos y se secuenció una parte de los péptidos mediante espectrometría de masas PSD-MALDI-TOF. Con este procedimiento, pudieron determinarse ocho sitios de O-glucosilación de la BSP recombinante, 5 en el péptido 211-229 (TTTSP... QVYR) y como máximo 3 en el péptido entre los aa 120 y aa 135 con la secuencia TGLAA. Por ello, las treoninas están glucosiladas en la secuencia DATPGTG de la BSP recombinante. En la BSP ósea, se realiza una tercera O-glucosilación. En la BSP recombinante, no está presente un tercer sitio de glucosilación. Presuntamente, este sitio de glucosilación se encuentra en la estructura parcial TGLAA-BSP.

### *Ejemplo 5*

#### *Preparación de anti-BSP-IgY a partir de yemas de huevo*

Para la purificación de grandes cantidades de anti-BSP-IgY para terapia e inmunoescintigrafía, se describen distintos procedimientos. Se prefiere emplear el procedimiento de Akita y Nakal (Akita E.M. y col., "Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain", en *J. Immunol. Methods*. 1993, 160 (2), 207-14).

Para la producción de huevos, se usa una raza de alto rendimiento como "Lohmann blancas" o "Lohmann marrones" con un rendimiento de 4,5 huevos por semana y una producción de más de 10 mg de IgY específica por yema. La inmunización se realiza con antígeno de BSP aislada de hueso humano o recombinante en coadyuvante de Freund, aplicándose inyecciones de recuerdo cada 6 semanas después de una inmunización básica con aprox. 0,1 mg de BSP. Aproximadamente un 30% de estas gallinas normalmente no reaccionan a la inmunización. Se desinfectan externamente los huevos con ácido peracético, se cascan entonces y se separan las yemas de las claras. Se baten entonces las yemas con 5 a 10 volúmenes de agua destilada enfriada con hielo a entre pH 5 y 5,2 y se incuban a 2 a 5°C durante 2 a 6 h. Sedimentan así los gránulos de yema, que están compuestos esencialmente por lipoproteínas. Se filtra entonces por papel de filtro para aclarar el sobrenadante acuoso (por ejemplo, Whatman N° 1).

A partir de este sobrenadante, pueden purificarse homogéneamente los anti-BSP-IgY directamente mediante cromatografía de afinidad. Se une por enlace químico covalente a una columna de Sepharose-4B activada con bromuro de cianógeno BSP aislada de hueso humano o de sobrenadantes de cultivo de líneas celulares humanas recombinantes. Para la unión de 1 g de IgY, es necesario 0,5 g de BSP inmovilizada (unida covalentemente a aprox. 5 ml de Sepharose™).

## ES 2 336 770 T3

La IgY unida se eluye con un gradiente ácido y después se neutraliza la disolución. Esta disolución debe entonces desalarse y concentrarse los anticuerpos, lo que es posible en gran medida con un procedimiento de flujo cruzado (por ejemplo, Amicon™ Spiralfilter SY100 con una exclusión de 100.000 Da).

### 5 Ejemplo 6

#### *Aislamiento de anti-BSP-IgY que está unido al complejo BSP-factor H*

10 La baja reacción de los anticuerpos policlonales de gallina con BSP en la matriz ósea puede superarse mediante la selección de aquel anticuerpo que reaccione con BSP en el complejo con factor H. Así, se une por enlace químico covalente el factor H o la BSP aislada de hueso o preparada por ingeniería genética a Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno y después, por mucho BSP o factor H aplicados o unidos a la columna, todos los ligandos en la matriz están complejados con la pareja. Se aplica entonces extracto de yema filtrado sobre esta columna de afinidad y se obtiene como en el ejemplo 4 sólo aquella fracción de anticuerpo que se une específicamente al epítipo libre del  
15 complejo BSP-factor H.

### Ejemplo 7

#### *Preparación de anticuerpos anti-BSP en gallinas transgénicas*

20 Los anti-BSP-IgY presentan algunas dificultades en terapia o diagnóstico humano. Así, han de esperarse efectos secundarios como reacciones contra proteínas extrañas y la semivida biológica asciende en comparación con los anticuerpos humanos sólo a 12 a 24 horas. La IgY no activa tampoco el sistema de complemento.

25 Los anticuerpos humanos contra BSP pueden prepararse en gallinas transgénicas especiales en las que se ha intercambiado mediante modificación genética dirigida la región constante de inmunoglobulina aviar en los genes responsables de la formación de anticuerpos por la región constante de inmunoglobulina humana. Se describen células de gallina y sistemas de vector adecuados en las patentes de EE.UU. nº 5.340.740, nº 5.656.479 y nº 5.464.764. Después de inmunización con BSP, dichas gallinas reaccionan con la producción de anticuerpos humanos en el huevo.

30

### Ejemplo 8

#### *Análisis de inmunotransferencia de la expresión de BSP en líneas celulares de cáncer de mama humanas*

35 Se extrajeron las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 (línea celular de cáncer de mama, negativa de receptor de estrógeno), MCF-7 (línea de cáncer de mama, positiva de receptor de estrógeno) y T-47-D (línea de cáncer de mama, positiva de receptor de estrógeno) con tampón de inmunoprecipitación y se precipitó la BSP con la mezcla de anticuerpos policlonales A0001 de conejo contra BSP humana. Se aplicaron los precipitados después de desnaturalización sobre geles de SDS, se llevó a cabo la electroforesis y se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa.  
40 Después, se realizó una inmunotinción con el antisuero de conejo anti-BSP A0001 y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BSP (BSP 1.2), usándose como segundo anticuerpo conjugados de peroxidasa de anticuerpos de cabra contra IgG de conejo y contra IgG de ratón. En ambas transferencias A y B, era claramente reconocible la banda de BSP inmunoprecipitada a 70.000 Da.

45 Para mostrar la presencia o ausencia de BSP en la superficie celular de células tumorales, se biotinilaron las superficies celulares de las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, se extrajeron con tampón de inmunoprecipitación y precipitó la BSP con la mezcla de anticuerpos policlonales A0001 de conejo contra BSP humana. Se aplicaron los precipitados después de desnaturalización sobre geles de SDS, se llevó a cabo la electroforesis y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Se detectaron entonces las proteínas biotiniladas sobre  
50 esta membrana con un conjugado de peroxidasa y estreptavidina con el sistema ECL (Amersham).

Se marcaron por inmunofluorescencia células de cáncer de mama humanas de las líneas T-47-D y MDA-MB-231 con y sin permeabilización previa con un anticuerpo de conejo anti-BSP de cerdo y un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con fluoresceína. La BSP marcada fluorescentemente es reconocible en ambas líneas celulares después  
55 de la permeabilización. Sólo en las células T-47-D podía detectarse BSP mediante inmunofluorescencia también sin permeabilización.

### Ejemplo 9

#### *Detección de la expresión de BSP en células tumorales mediante PCR-TI*

60 Se aisló ARNm de las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 (línea celular de cáncer de mama, negativa de receptor de estrógeno), MCF-7 (línea celular de cáncer de mama, positiva de receptor de estrógeno) y T-47-D (línea celular de cáncer de mama, positiva de receptor de estrógeno) y fibroblastos humanos (HGF) como células de control, se preparó el ADN complementario mediante transcriptasa inversa y se amplificó el ADNc de BSP mediante PCR con cebadores específicos de BSP. La expresión de ARNm de BSP era especialmente alta en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, baja en las células MDA-MB-231 y T-47-D y no detectable en la línea celular de control.

## Ejemplo 10

*Preparación de anticuerpos monoclonales humanizados*

5 El anticuerpo monoclonal BSP1.2 puede utilizarse debido a su unión específica a BSP tumoral para la terapia de tumores primarios y metástasis. A este respecto, el anticuerpo se une a BSP en la superficie celular de determinadas células tumorales y estimula el sistema inmunitario para la destrucción de estas células, por ejemplo, mediante la activación de la cascada de complemento. Igualmente, pueden utilizarse también los IgY anti-BSP policlonales o monoclonales para terapia. Con el empleo de estos anticuerpos, el sistema inmunitario humano reacciona con la  
10 formación de anticuerpos endógenos humanos anti-IgG de ratón (HAMA) o anticuerpos anti-IgY de gallina (HACA). Los HAMA y HACA pueden inducir y reforzar una respuesta inmunitaria del organismo ante el antígeno tumoral. En la determinación de los marcadores tumorales, se generan sin embargo interferencias con los HAMA y HACA que alteran los procedimientos de medida *in vitro*. De este modo, aparecen altos valores de medida falsos para marcadores tumorales.

15 Por tanto, son especialmente adecuados para la terapia e inmunoescintigrafía los anticuerpos monoclonales humanizados. Se describen muchos procedimientos de cómo se derivan los correspondientes anticuerpos humanizados a partir de líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales anti-BSP.

## 20 Ejemplo 11

*Conjugados de anticuerpos anti-BSP con venenos celulares y radioisótopos*

25 En una aplicación adicional de la invención, pueden unirse por enlace químico covalente venenos celulares y radioisótopos con anticuerpos anti-BSP o sus fragmentos Fab. Con radioisótopos como yodo 125 o yodo 131, los anticuerpos marcados son adecuados en la aplicación de bajas cantidades para la localización tumoral mediante inmunoescintigrafía y en la aplicación de grandes cantidades para la destrucción directa de los tumores. Dichos conjugados químicos pueden prepararse, por ejemplo, mediante yodación de anticuerpos con yodo 125 ó 131 (Garvey, J.S. y col., "Methods in Immunology". 3ª ed., W. A. Benjamin Publ., 1977, 171-182). Se encuentra una visión general sobre  
30 los procedimientos adecuados para radioinmunoterapia e inmunoescintigrafía en Vuillez, "Radioimmunotargeting: diagnosis and therapeutic use", en *Bull. Cáncer*. 2000, 87(11), 813-27.

## Ejemplo 12

35 *Terapia de tumores con expresión de BSP sobre la superficie celular*

Se comprobó en primer lugar en material de biopsia si la BSP se expresa sobre la superficie de células tumorales. Los pacientes en que es detectable BSP sobre la superficie de células tumorales se tienen en cuenta para terapia con anticuerpos anti-BSP de gallina, de ratón, los correspondientes anticuerpos humanizados y con conjugados de estos anticuerpos con venenos celulares o radioisótopos.  
40

El tratamiento de tumores con anticuerpos terapéuticos que están dirigidos contra marcadores tumorales expresados sobre superficies celulares es estado de la técnica. Así, puede someterse exitosamente a terapia con el anticuerpo humanizado herceptina contra el receptor del factor de crecimiento epitelial humano incluso cáncer de mama en forma metastatizada en aproximadamente un 25% de los afectados. (Hotaling TE y col., "The humanized anti-HER2 antibody rhuMAb HER2 mediates antibody dependent cell-mediated cytotoxicity vía FcγR III" [resumen]. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* 1996; 37: 47; Pegram MD y col., "Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in breast cancer patients in Phase III clinical trials of a humanized anti-HER2 antibody" [resumen] *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1997; 38: 602.  
45

50 Igualmente que con la herceptina, el correspondiente anticuerpo anti-BSP puede aplicarse en forma de infusión, por ejemplo de infusión de 90 minutos, en la primera aplicación y después en forma de infusión de 30 minutos. La frecuencia de las infusiones y la cantidad de anticuerpos se ajusta según la vida media del anticuerpo en la sangre (aprox. 6 días en un anticuerpo humanizado y menos de 24 horas en un anticuerpo de gallina) y el peso corporal.  
55

## Ejemplo 13

*Terapia de tumores mediante neutralización de BSP libre no unida a células y del complejo BSP-factor H*

60 Se comprobó con los procedimientos anteriormente descritos que las células tumorales de pacientes expresan BSP que no puede detectarse sobre la superficie celular. En estos tumores, puede suponerse que las células suministran BSP a la sangre o fluidos tisulares y, por ejemplo, sirve para la unión de factor H para inactivar la ruta alternativa de la cascada de complemento o para la emigración a tejidos óseos. Son un posible indicador adicional para este tipo tumoral las concentraciones elevadas de BSP en suero sanguíneo (> 20 ng/ml de suero). En estos casos, los anticuerpos anti-BSP pueden utilizarse para neutralizar la BSP tumoral libre o complejada con factor H. La dosis puede determinarse a este respecto por la cantidad presente de BSP libre en suero y en fluido tisular. Para la terapia, se tienen en cuenta anticuerpos anti-BSP de gallina, de ratón y anticuerpos anti-BSP humanizados que pueden reconocer el epítipo de BSP libre en complejo con factor H. También se tienen en cuenta los fragmentos Fab de estos anticuerpos,  
65

que pueden prepararse según un procedimiento estándar mediante digestión proteolítica (Garvey, J.S. y col., "Methods in Immunology". 3ª ed., W. A. Benjamín Publ., 1977, 256-266). También se tienen en cuenta para dicha terapia fragmentos Fab preparados por ingeniería genética derivados a partir de los anticuerpos anti-BSP anteriores.

- 5 La invención procura por tanto anticuerpos contra la sialoproteína ósea humana (BSP<sub>h</sub>) que se unen específicamente sólo a epítomos de BSP<sub>h</sub> de células tumorales, porque la BSP<sub>h</sub> tumoral no contiene O-glucosilación postraduccional en el intervalo de los aminoácidos 120 a 135 (SWISSPROT: SIAL\_HUMAN. N° de acceso P21815, sin secuencia señal), que contiene los aminoácidos TGLAA. Al contrario la BSP<sub>h</sub> normal de hueso. Los anticuerpos pueden reconocer BSP<sub>h</sub> sérica tumorigénica en complejo con el factor H de complemento y formar por tanto un instrumento de diagnóstico y terapéutico valioso.

#### Ejemplo 14

##### *Preparación de anticuerpos específicos contra BSP u otros agrupamientos de proteoma de superficie de célula tumoral*

- 15 Para la preparación de anticuerpos específicos contra las proteínas citadas, se ha mostrado sorprendentemente que, además del uso de moléculas completas, también son adecuadas secuencias aminoacídicas específicas de epítomos especialmente para la inmunización, cuando los péptidos sintéticos se acoplan con moléculas portadoras según los procedimientos habituales y se inyectan en ratones. Además, son adecuados también múltiples péptidos antigénicos (véase anteriormente las secuencias) que se unen mediante lisina a moléculas grandes, o líneas celulares transfectadas con BSP, para preparar estos anticuerpos. Se ha probado como otro procedimiento sorprendentemente bueno el uso de inmunógenos de células transfectadas establemente que expresan BSP, en el que se usaban aislamientos de membrana, extractos celulares con receptores completos o fragmentados o también preparados completos liofilizados.

- 25 Se utilizaron ratones (de tipo NZW X NZB) para la preparación de anticuerpos monoclonales, lo que se realizó con los procedimientos rutinarios de Immundiagnostik AG e IPF PharmaCeuticals GmbH. Los anticuerpos examinados mediante transferencia Western y ELISA pueden utilizarse después de alta purificación para los fines de diagnóstico y terapéuticos citados.

#### Ejemplo 15

##### *Inducción de la apoptosis mediante anticuerpos específicos de BSP en líneas celulares que expresan BSP*

- 35 Los análisis de expresión en distintas líneas celulares han mostrado, entre otros, que las líneas celulares de tumor de próstata, así como las líneas celulares de tumor de mama, expresan BSP. Se llevó a cabo este análisis de expresión a nivel de ARNm mediante PCR-TI y a nivel de proteína mediante transferencia Western y análisis FACS. Un tratamiento de estas líneas celulares tumorales que expresan BSP con anticuerpos específicos de BSP ha conducido en células cultivadas a la muerte celular programada, lo que pudo detectarse entre otros mediante citometría de flujo.

#### Ejemplo 16

##### *Reducción de metástasis óseas en modelo animal*

- 45 Después de la aplicación de líneas celulares tumorales que expresan BSP en ratones/ratas desnudos inmunodeficientes, se llega regularmente a una metastatización ósea. Con la toma simultánea del anticuerpo específico de BSP, se llegó sorprendentemente a una clara reducción de la formación de metástasis óseas manifiestas, lo que pudo documentarse mediante análisis histológico de los tejidos.

##### *1. Material y metodología*

- 50 Este modelo animal comprendía la inyección de células de cáncer de mama y la posterior terapia de las lesiones líticas generadas con los anticuerpos anti-BSP, que representan una mezcla de anticuerpos policlonales IgY de gallina con especificidad predominante por BSP humana de células tumorales, que además se unen cuantitativamente a BSP<sub>h</sub> en suero humano en presencia de factor H y que se unen predominantemente a un epítomo en el intervalo de aminoácidos 120 a 135 de la BSP<sub>h</sub>, modificándose la glucosilación postraduccional en este intervalo en BSP<sub>h</sub> de las células tumorales frente a la BSP natural de hueso.

- 60 Se inyectaron células MDA-MB 231 (ATCC, HTB-26) que se aplicaron por vía intracardiaca en un estudio precedente a ratones desnudos (T. A. Guise, 1997; "PTH-rP and Bone Metastases"; American Cancer Society). Se obtuvo la línea celular a partir de un adenocarcinoma humano metastatizado, no posee además receptores de estrógeno. En este caso, estaba marcada con proteína fluorescente verde (GFP), lo que facilitaba el descubrimiento de las células en preparado histológico. Como animales de ensayo, se usaron ratas desnudas de 6 a 8 semanas de edad (RNU, Charles River Breeding, Sulzfeld, Alemania) a las que se había reducido su inmunocompetencia, de modo que las células humanas inyectadas no se reconocieran como tal y se combatieran. Los análisis previos con distintos recuentos celulares en hombres y mujeres dieron como resultado que las metástasis fueran visibles en ratas masculinas después de la inyección de 10<sup>5</sup> células MDA-MB 231 después de aproximadamente 1 mes en forma de lesiones líticas.

## ES 2 336 770 T3

Se inyectaron las células ( $1 \times 10^5$  en tampón PBS) por vía intraarterial en la *A. femoralis* (0,2 ml; n=8). Para ello, se canuló una rama lateral de este vaso y después de la inyección se ligó para impedir la salida de las células incorporadas. El animal compensa sin problemas la pérdida del vaso mediante formación colateral. Las células cancerosas llegan entonces con la sangre a las ramificaciones finas de las ramas alimentadas de fémur, tibia y peroné. Tiene lugar aquí en los vasos terminales extravasación y la consiguiente adhesión de células a la matriz ósea. Probablemente, se realiza aquí también la interacción con BSP.

La vigilancia posterior del crecimiento de metástasis se realizó durante 10 días con radiografías de rayos X anteroposteriores y posteroanteriores convencionales con anestesia con éter del animal. Se efectuó la cuantificación aproximada de la lesión mediante medida de la longitud y anchura de su extensión.

Después de dos controles de rayos X positivos, se trataron los animales con anticuerpo anti-BSP o patrón. Se realizó la terapia en los animales descritos una vez por semana por vía subcutánea a una concentración de 10 mg/kg de peso corporal.

Se realizó la observación posterior de los animales además mediante tomografía computerizada e histología (todavía no completada). La TC permite una reconstrucción tridimensional del hueso y del defecto así como una medida exacta del tamaño de la lesión. Después del tiempo de observación, se sacrificaron los animales y se analizaron histológicamente. Mediante el mareaje con GFP, las células son visibles bajo luz UV en el preparado de corte óseo. Además, pueden encontrarse evidencias histológicas más exactas mediante la remodelación previa del tejido óseo.

### 2. Resultados

Se documentan por ejemplo los resultados en las siguientes series de figuras 4 a 5. Se observaron los animales más de 3 meses después de la operación por diagnóstico con rayos X (Siemens Opti 150/30/50 HC-100). En los desarrollos de las curvas, ha de observarse que los datos de superficie aplicados a las ordenadas de tamaño de lesión en  $\text{mm}^2$  son distintos en ambos animales mostrados. En total, se trataron 8 animales.

Los animales 987 y 988 (véanse las figuras) se trataron por vía subcutánea con el anticuerpo anti-BSP (10 mg/kg) una vez por semana. La duración total del tratamiento ascendió a aprox. 50 días. La terapia empezó después de 2 ó 3 controles de rayos X positivos. Esto corresponde en el animal 987 al día 46 después de la operación y en el animal 988 al día 32 después de la operación.

A un rápido aumento del tamaño de la lesión a partir del día 24 después de la operación en el animal 988 siguió una lisis continua del hueso, que condujo a partir del día 38 a una fractura del tercio medio de la tibia. Esto tuvo lugar con la terapia empezada (a partir del día 32). Las primeras tendencias de curación se mostraron a partir del día 52 en forma de formación de callo en el sitio de fractura y también las lesiones en la tibia proximal y el fémur distal se hicieron menores. Los límites exteriores de las lesiones estaban inicialmente delimitados nítidamente, después durante la curación estaban cada vez menos nítidamente limitados. La neoplasia del hueso se realizó desde el borde exterior de fuera a dentro hasta el centro de la lesión. A partir del día 89, el tamaño de la lesión era difícilmente cuantificable, ya que por la formación de callo creciente no eran ya reconocibles los bordes exactos. Después del día 126, puede hablarse de una remisión total, como muestra la imagen adjunta (desaparición completa de la lesión lítica reconocible por rayos X). Las reconstrucciones por TC tridimensionales (Siemens Somato Plus 4, Volume Zoom) muestran los cambios de la lesión de la tibia después de 31 y 80 días después de la operación. Es visible un claro aumento del tejido óseo.

Se trató el animal 987 después de 3 hallazgos de rayos X positivos también con 10 mg/kg s.c. una vez por semana a partir del día 46. Aquí se mostró sólo una metástasis en el fémur distal, que ya desde el día 89 después de la operación (o sea 42 días de terapia) estaba curada en el hueso.

Se sometieron a terapia otros animales en las mismas condiciones hasta cinco veces por semana con 10 mg/kg s.c. y hasta dos veces por semana con 10 mg/kg i.v. Se observó sin embargo un aumento del tamaño de la lesión durante y después de la terminación de la terapia, cuando se indujo mediante el tratamiento una reacción inmunitaria contra los anticuerpos de BSP inyectados.

Comparativamente, se sometieron a terapia animales con alquilfosfocolina Er-PC<sub>3</sub> 40  $\mu\text{mol/kg}$  i.v. dos veces por semana, que a esta concentración pudo remitir el carcinoma de mama primario (control positivo), pero en metástasis óseas no mostró efecto [Berger, M. R. y col., (1998) "Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocholines". *Drugs of Today*, 34 (supl. F), 73-81]. Aquí no se mostró ningún cambio después de la terminación de la terapia en un animal, en otro incluso un empeoramiento de la situación (progresión) en comparación con el inicio de la terapia.

Es por tanto objeto de la presente invención un medicamento que contiene anticuerpos o moléculas de unión como aptámeros contra BSP específica de tumor u otros ligandos de la misma proteína. Puede reforzarse también el uso de la aplicación de medicamento propuesta mediante el empleo de las siguientes sustancias: anticuerpos, ligandos o inhibidores que interactúan con moléculas de adhesión, proteasas asociadas a membrana o receptores que median el quimiotactismo como, por ejemplo, receptores de quimiocina, así como sustancias inductoras de la apoptosis como preferiblemente anticuerpos o proteínas/péptidos que pueden obtenerse a partir de peptidotecas naturales o artificiales.

## ES 2 336 770 T3

El medicamento puede emplearse solo o en combinación con las sustancias anteriormente citadas particularmente para terapia de enfermedades tumorales, preferiblemente de metástasis óseas.

5 La invención se refiere además a un procedimiento para la terapia y el uso médico y comercial de los anticuerpos  
contra BSP citados u otros ligandos de la misma proteína o su combinación con anticuerpos, ligandos o inhibidores  
reforzantes que interaccionan con moléculas de adhesión, proteasas asociadas a membrana o receptores que median  
el quimiotactismo como, por ejemplo, receptores de quimiocina, así como sustancias inductoras de la apoptosis como  
preferiblemente anticuerpos o proteínas/péptidos que pueden obtenerse a partir de peptidotecas naturales o artificiales,  
10 para inhibir el crecimiento canceroso incluyendo la metástasis. El procedimiento se basa en la comprobación de que  
la BSP puede actuar sobre células tumorales específicas mediante la configuración específica de enfermedad de la  
expresión. Se controla el comportamiento de migración y proliferación de tumores primarios y secundarios, entre  
otros, mediante la BSP. Así, resulta la posibilidad de impedir decisivamente o reprimir completamente el crecimiento  
del cáncer así como la metastatización tumoral mediante el citado procedimiento/terapia.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 336 770 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpos, inmunotoxinas, moléculas con estructura de unión a BSP de receptores de BSP naturales o moléculas de factor H y aptámeros o Spiegelmer® basados en ADN o ARN, que se unen a sialoproteína ósea o fragmentos de la misma en suero o plasma, para uso como principio activo en el tratamiento de metástasis óseas y tumores que expresan BSP que colonizan preferiblemente tejidos óseos.
- 10 2. Principios activos según la reivindicación 1 que se unen específicamente a sialoproteína ósea humana (BSP<sub>h</sub>) o fragmentos de la misma en suero o plasma.
3. Principios activos según la reivindicación 1 ó 2 que se unen específicamente a sialoproteína ósea de células tumorales.
- 15 4. Principios activos según una de las reivindicaciones precedentes, preparados contra sialoproteína ósea modificada química o naturalmente en la glucosilación o un fragmento de la misma.
- 20 5. Principios activos según la reivindicación 4, preparados contra sialoproteína ósea de material óseo cuyo donante no es capaz de una glucosilación normal de las proteínas óseas.
- 25 6. Principios activos según una de las reivindicaciones precedentes que se unen específicamente a sialoproteína ósea humana (BSP<sub>h</sub>) cuya glucosilación postraduccional en el intervalo de los aminoácidos 120 a 135 (SWISSPROT: SIAL\_HUMAN, n° de acceso P21816), que incluye los aminoácidos TGLAA, está modificada o incompleta frente a la sialoproteína ósea normal de hueso.
- 30 7. Principios activos según una de las reivindicaciones precedentes, preparados contra un epítipo de BSP<sub>h</sub> que comprende la secuencia aminoacídica TGLAA o YTGLAA y grupos de azúcar opcionales.
8. Principios activos según una de las reivindicaciones precedentes, preparados contra un antígeno de BSP<sub>h</sub> con la secuencia aminoacídica YTGALAAIQLPKKAGD (SEQ ID N° 1).
- 35 9. Principio activo según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el principio activo es un anticuerpo IgY de gallina.
10. Principio activo según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo es humano o humanizado.
- 40 11. Principio activo según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el principio activo es un anticuerpo biespecífico que incluye un paratopo adicional que preferiblemente es específico del epítipo de CD3.
12. Principio activo según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el principio activo es una inmunotoxina que es un conjugado de molécula de unión y un resto con actividad citotóxica.
- 45 13. Principio activo según la reivindicación 11, en el que el conjugado incluye la cadena A de ricina o un fragmento no de unión de la toxina de la difteria.
14. Principio activo según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el principio activo se acopla con un radionucleido.
- 50 15. Composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades por tumores y sus metástasis que colonizan preferiblemente tejidos óseos, que contiene un principio activo según una de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 15, que contiene al menos otro anticuerpo, ligando o inhibidor seleccionado de moléculas de adhesión, proteasas asociadas a membrana, receptores mediadores del quimiotacismo, receptores de quimiocina y sustancias inductoras de la apoptosis.
- 55 17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, en la que los inhibidores bloquean al menos parcialmente la BSP y por tanto modulan su función.
- 60 18. Principio activo o composición farmacéutica según una de las reivindicaciones precedentes para el tratamiento de tumores que expresan BSP del grupo de tumores de próstata, mama, pulmón, riñón y tiroides, enfermedades tumorales del sistema sanguíneo, del sistema linfático, del sistema cardiocirculatorio, del sistema nervioso, del tracto respiratorio, del tracto digestivo, del sistema endocrino, de la piel incluyendo anejos, del aparato locomotor y del tracto urogenital, incluyendo los riñones.

65

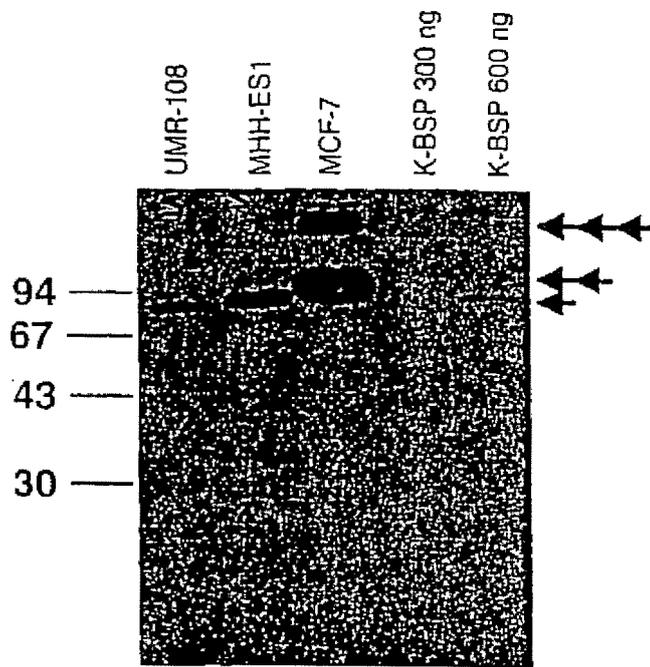


Fig. 1

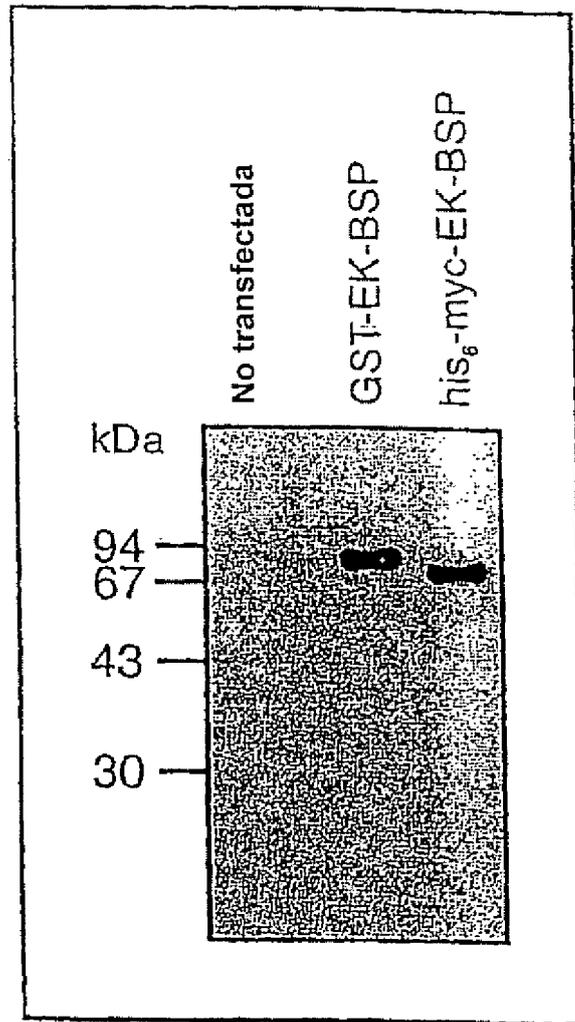


Fig. 2

Phe-Ser-Met-Lys-Asn-Leu-His-Arg-Arg-Val<sup>10</sup>-Lys-Ile-Glu-Asp-Ser-  
 Glu-Glu-Asn-Gly-Val<sup>20</sup>-Phe-Lys-Tyr-Arg-Pro-Arg-Tyr-Tyr-Leu-Tyr<sup>30</sup>-  
 Lys-His-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-His-Leu-Lys<sup>40</sup>-Arg-Phe-Pro-Val-Gln-  
 Gly-Ser-Ser-Asp-Ser<sup>50</sup>-Ser-Glu-Glu-Asn-Gly-Asp-Asp-Ser-Ser-Glu<sup>60</sup>-  
 Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Thr-Ser-Asn<sup>70</sup>-Glu-Gly-Glu-Asn-Asn-  
 Glu-Glu-Ser-Asn-Glu<sup>80</sup>-Asp-Glu-Asp-Ser-Glu-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr<sup>90</sup>-  
 Leu-Ser-Ala-Thr-Thr-Leu-Gly-Tyr-Gly-Glu<sup>100</sup>-Asp-Ala-Thr-Pro-Gly-  
 Thr-Gly-Tyr-Thr-Gly<sup>110</sup>-Leu-Ala-Ala-Ile-Gln-Leu-Pro-Lys-Lys-Ala<sup>120</sup>-  
 Gly-Asp-Ile-Thr-Asn-Lys-Ala-Thr-Lys-Glu<sup>130</sup>-Lys-Glu-Ser-Asp-Glu-  
 Glu-Glu-Glu-Glu-Glu<sup>140</sup>-Glu-Glu-Gly-Asn-Glu-Asn-Glu-Glu-Ser-Glu<sup>150</sup>-  
 Ala-Glu-Val-Asp-Glu-Asn-Glu-Gln-Gly-Ile<sup>160</sup>-Asn-Gly-Thr-Ser-Thr-  
 Asn-Ser-Thr-Glu-Ala<sup>170</sup>-Glu-Asn-Gly-Asn-Gly-Ser-Ser-Gly-Gly-Asp<sup>180</sup>-  
 Asn-Gly-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu-Glu-Ser-Val<sup>190</sup>-Thr-Gly-Ala-Asn-Ala-  
 Glu-Gly-Thr-Thr-Glu<sup>200</sup>-Thr-Gly-Gly-Gln-Gly-Lys-Gly-Thr-Ser-Lys<sup>210</sup>-  
 Thr-Thr-Thr-Ser-Pro-Asn-Gly-Gly-Phe-Glu<sup>220</sup>-Pro-Thr-Thr-Pro-Pro-  
 Gln-Val-Tyr-Arg-Thr<sup>230</sup>-Thr-Ser-Pro-Pro-Phe-Gly-Lys-Thr-Thr-Thr<sup>240</sup>-  
 Val-Glu-Tyr-Glu-Gly-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Thr<sup>250</sup>-Gly-Val-Asn-Glu-Tyr-  
 Asp-Asn-Gly-Tyr-Glu<sup>260</sup>-Ile-Tyr-Glu-Ser-Glu-Asn-Gly-Glu-Pro-Arg-  
 Gly-Asp-Asn-Tyr-Arg-Ala-Tyr-Glu-Asp-Glu<sup>280</sup>-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Lys-  
 Gly-Gln-Gly-Tyr-Asp<sup>290</sup>-Gly-Tyr-Asp-Gly-Gln-Asn-Tyr-Tyr-His-His<sup>300</sup>-  
 Gln

Fig. 3

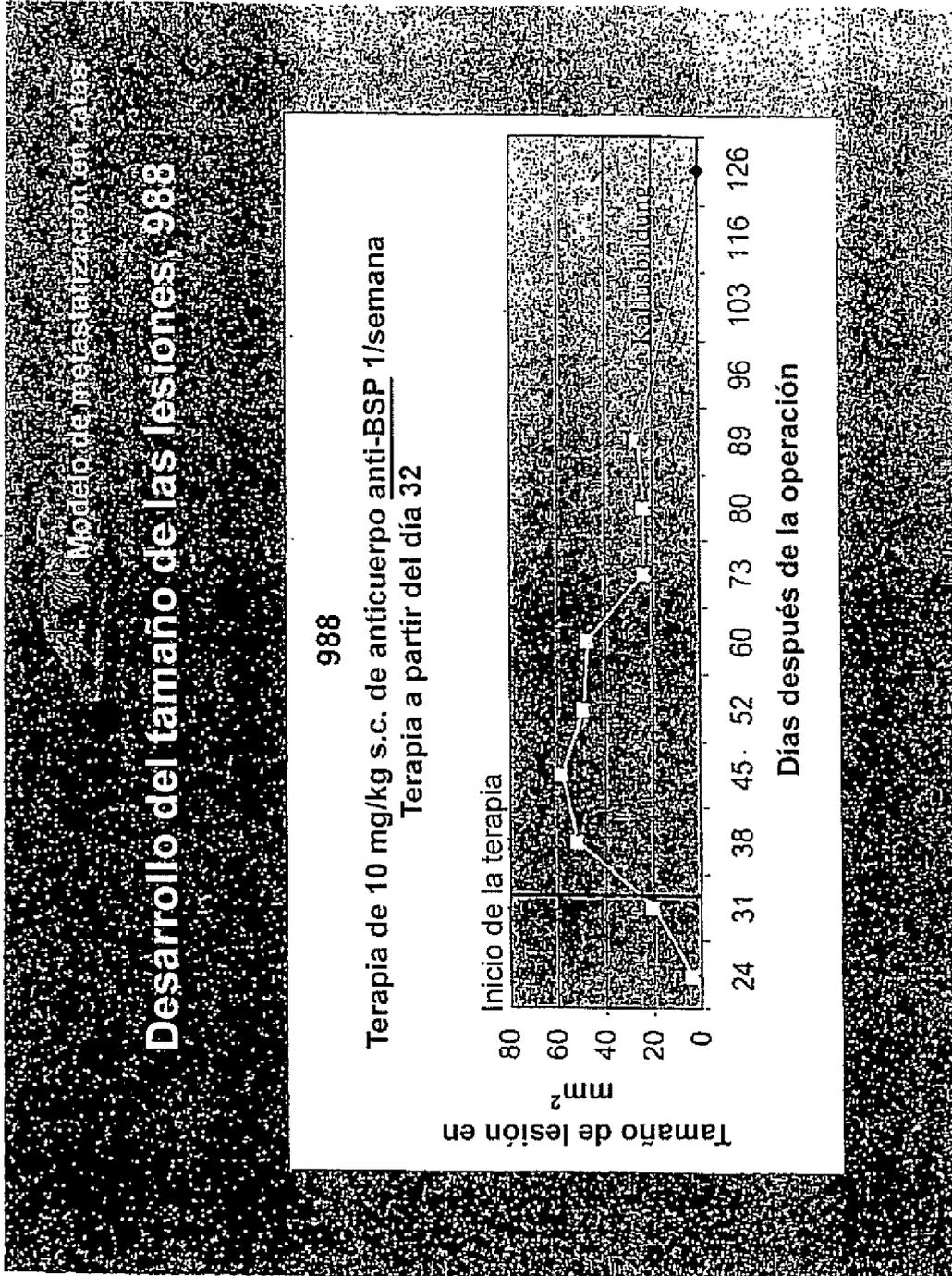


Fig. 4a

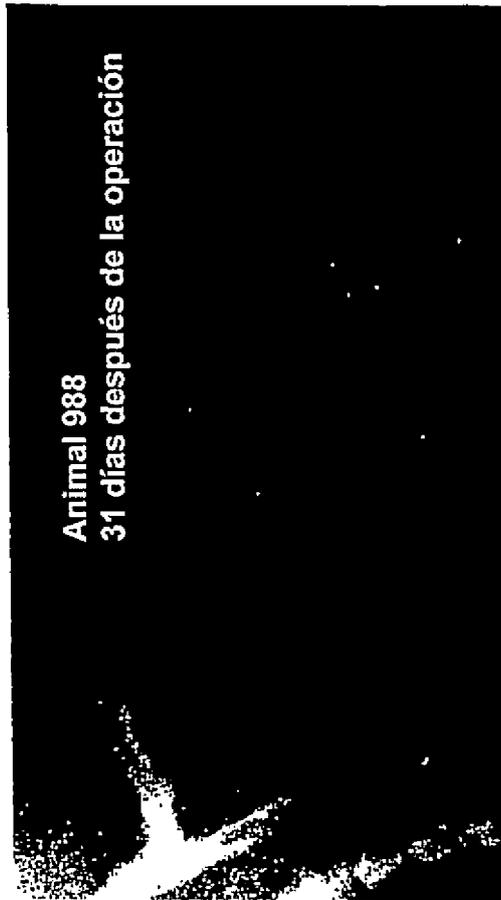
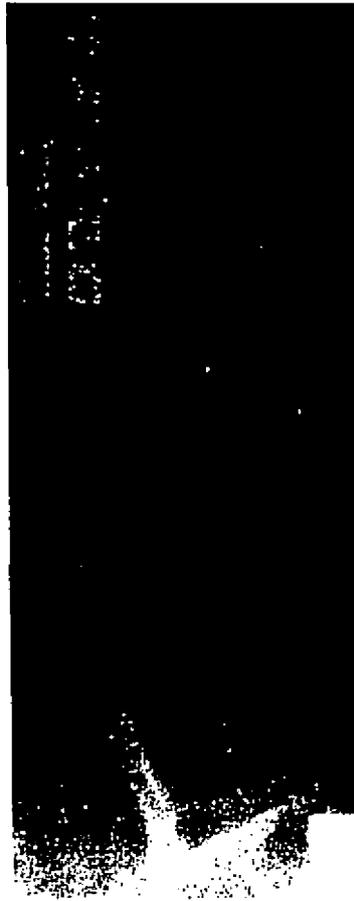


Fig. 4b



**Fig. 4c**

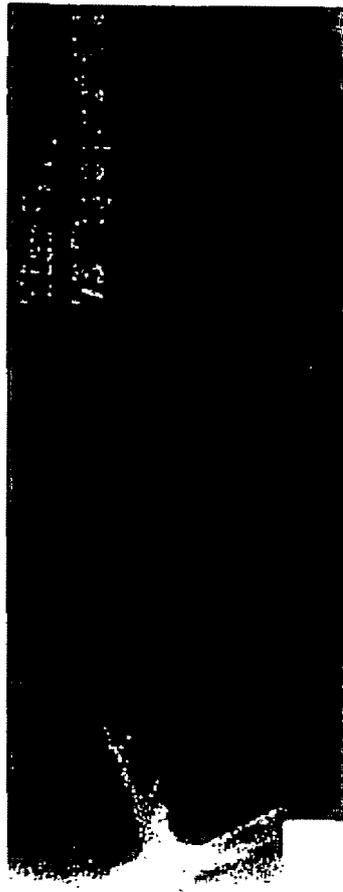
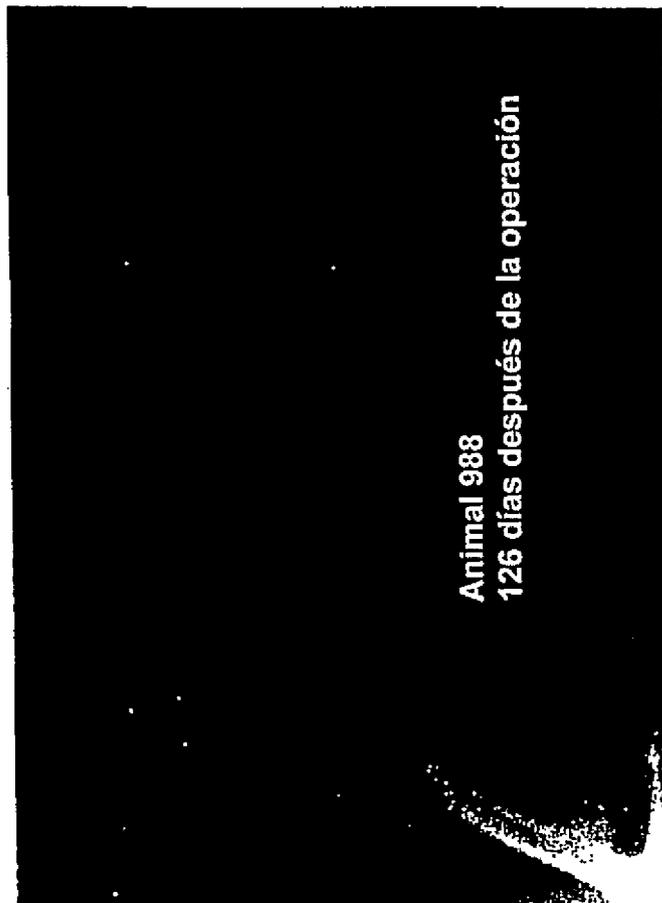


Fig. 4d



**Fig. 4e**

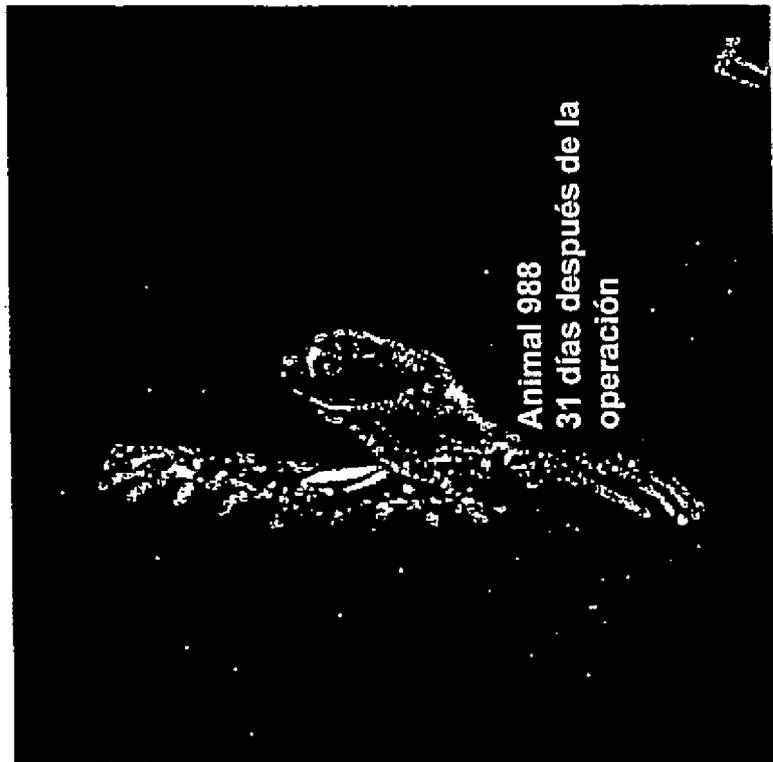


Fig. 4f

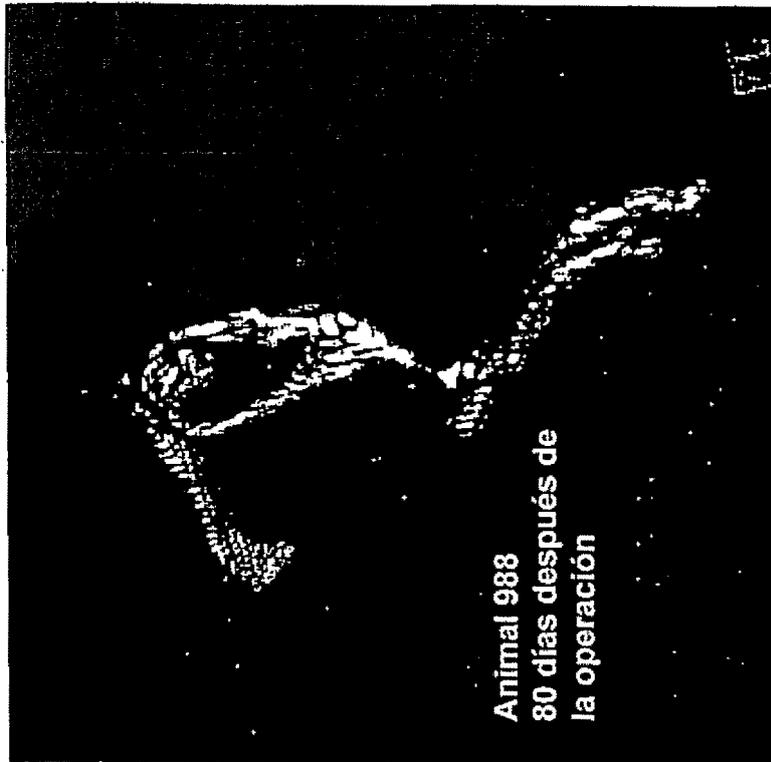


Fig. 4g

Modelo de metastatización en ratas

## Desarrollo del tamaño de las lesiones, 987

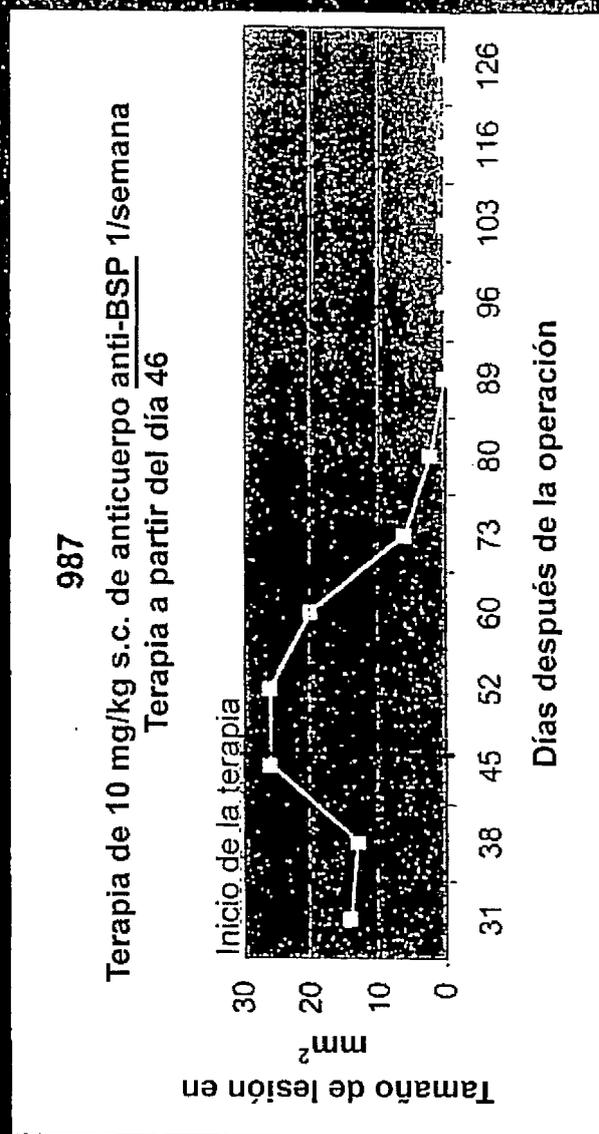


Fig. 5a



**Fig. 5b**



Fig. 5c

# ES 2 336 770 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Osteopep-Pharma GmbH  
<120> Medicamento para el tratamiento de tumores y sus metástasis  
5 <130> HL-77234.003/UMB  
<140>  
<141>  
10 <150> EP 01114388.0  
<151> 13-06-2001  
<160> 14  
<170> PatentIn versión 2.1  
15 <210> 1  
<211> 15  
<212> PRT  
20 <213> *Homo sapiens*  
  
<400> 1  
Tyr Thr Gly Leu Ala Ala ile Gln Leu Pro Lys Lys Ala Gly Asp  
25 1 5 10 15  
  
<210> 2  
<211> 301  
30 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 2  
35 Phe Ser Met Lys Asn Leu His Arg Arg Val Lys Ile Glu Asp Ser Glu  
1 5 10 15  
  
40 Glu Asn Gly Val Phe Lys Tyr Arg Pro Arg Tyr Tyr Leu Tyr Lys His  
20 25 30  
  
45 Ala Tyr Phe Tyr Pro His Leu Lys Arg Phe Pro Val Gln Gly Ser Ser  
35 40 45  
  
50 Asp Ser Ser Glu Glu Asn Gly Asp Asp Ser Ser Glu Glu Glu Glu Glu  
50 55 60  
  
55 Glu Glu Glu Thr Ser Asn Glu Gly Glu Asn Asn Glu Glu Ser Asn Glu  
60  
  
65

ES 2 336 770 T3

	65					70						75				80
5	Asp	Glu	Asp	Ser	Glu	Ala	Glu	Asn	Thr	Thr	Leu	Ser	Ala	Thr	Thr	Leu
					85					90					95	
10	Gly	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ala	Thr	Pro	Gly	Thr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ala
					100					105					110	
15	Ala	Ile	Gln	Leu	Pro	Lys	Lys	Ala	Gly	Asp	Ile	Thr	Asn	Lys	Ala	Thr
					115					120					125	
20	Lys	Glu	Lys	Glu	Ser	Asp	Glu	Gly	Asn							
					130					135					140	
25	Glu	Asn	Glu	Glu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Asp	Glu	Asn	Glu	Gln	Gly	Ile
					145					150					155	
30	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu	Asn	Gly	Asn	Gly	Ser
					165					170					175	
35	Ser	Gly	Gly	Asp	Asn	Gly	Glu	Glu	Gly	Glu	Glu	Glu	Ser	Val	Thr	Gly
					180					185					190	
40	Ala	Asn	Ala	Glu	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Gly	Gly	Gln	Gly	Lys	Gly	Thr
					195					200					205	
45	Ser	Lys	Thr	Thr	Thr	Ser	Pro	Asn	Gly	Gly	Phe	Glu	Pro	Thr	Thr	Pro
					210					215					220	
50	Pro	Gln	Val	Tyr	Arg	Thr	Thr	Ser	Pro	Pro	Phe	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr
					225					230					235	
55	Val	Glu	Tyr	Glu	Gly	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Thr	Gly	Val	Asn	Glu	Tyr	Asp
					245					250					255	
60	Asn	Gly	Tyr	Glu	Ile	Tyr	Glu	Ser	Glu	Asn	Gly	Glu	Pro	Arg	Gly	Asp
					260					265					270	
65	Asn	Tyr	Arg	Ala	Tyr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly
					275					280					285	
70	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asn	Tyr	Tyr	His	His	Gln			
					290					295					300	

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 336 770 T3

<400> 3  
 Leu Gly Tyr Gly Glu Asp Ala Thr Pro Gly Thr Gly  
 1 5 10

5 <210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 10 <213> *Homo sapiens*

<400> 4  
 Glu Thr Gly Gly Gln Gly Lys Gly Thr Ser Lys Thr  
 15 1 5 10

<210> 5  
 <211> 12  
 20 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5  
 25 Phe Lys Gly Gln Gly Tyr Asp Gly Tyr Asp Gly Gln  
 1 5 10

<210> 6  
 30 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 6  
 Ile Gln Leu Pro Lys Lys Ala Gly Asp Ile Thr Asn Lys Ala Thr  
 1 5 10 15

40 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 45 <213> *Homo sapiens*

<400> 7  
 Tyr Thr Gly Leu Ala Ala Ile Gln Leu Pro Lys Lys Ala Gly Asp  
 50 1 5 10 15

<210> 8  
 <211> 17  
 55 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8  
 60 Gly Asp Ile Thr Asn Lys Ala Thr Lys Glu Lys Glu Lys Glu Ser Asp  
 1 5 10 15  
 Glu

65 <210> 9  
 <211> 38  
 <212> PRT

ES 2 336 770 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

5 Ser Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Asn Tyr Arg Ala Tyr Glu Asp  
 1 5 10 15  
 10 Glu Tyr Ser Tyr Phe Lys Gly Gln Gly Tyr Asp Gly Tyr Asp Gly Gln  
 20 25 30  
 15 Asn Tyr Tyr His His Gln  
 35

<210> 10

<211> 15

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

25 Tyr Thr Gly Leu Ala Ala Ile Gln Leu Pro Lys Lys Ala Gly Asp  
 1 5 10 15

30 <210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 11

Tyr Glu Ser Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Asn Tyr Arg Ala Tyr  
 40 1 5 10 15  
 Glu Asp

45 <210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 12

Leu Lys Arg Phe Pro Val Gln Gly Gly  
 55 1 5

<210> 13

<211> 34

60 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

65 gcccgctagc ctctcaatg aaaaattgc atcg 34

<210> 14

# ES 2 336 770 T3

<211> 38

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

**caatgactgc ggccgcacac tgggggtggt agtaattc 38**

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65