

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 828**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08745748 .7**  
96 Fecha de presentación: **14.04.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2146735**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2010**

54 Título: **Composiciones que comprenden polipéptidos SPARC**

30 Prioridad:  
**13.04.2007 US 923340 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2012**

73 Titular/es:  
**ABRAXIS BIOSCIENCE, INC. (100.0%)**  
**11755 WILSHIRE BLVD., SUITE 2000**  
**LOS ANGELES, CA 90025, US**

72 Inventor/es:  
**TRIEU, VUONG y**  
**DESAI, NEIL P.**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 389 828 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

Composiciones que comprenden polipéptidos SPARC

5 **Antecedentes de la invención**

El agente anticancerígeno paclitaxel, comercializado con la marca registrada Taxol<sup>®</sup> por Bristol Myers Squibb, ha sido actualmente aprobado para el tratamiento de varios cánceres que incluyen cáncer de ovario, pulmón y mama. Una limitación importante al uso de paclitaxel es su mala solubilidad. Por consiguiente, la formulación de Taxol<sup>®</sup> contiene Cremophor<sup>®</sup> EL como vehículo solubilizante, pero la presencia de Cremophor<sup>®</sup> en esta formulación se ha ligado a graves reacciones de hipersensibilidad en animales (Lorenz y col., Agents Actions 7, 63-67, 1987) y seres humanos (Weiss y col., J. Clin. Oncol. 8, 1263-1268, 1990). Por consiguiente, los pacientes que reciben Taxol<sup>®</sup> requieren premedicación con corticosteroides (dexametasona) y antihistamínicos para reducir la hipersensibilidad y anafilaxis que se produce debido a la presencia de Cremophor<sup>®</sup>.

A diferencia, Abraxane<sup>®</sup>, también conocido como ABI-007, es una formulación de de paclitaxel nanopartículas de albúmina libre de Cremophor<sup>®</sup>, comercializado por Abraxis Oncology. El uso de una nanopartícula de albúmina como vehículo produce la formación de un coloide cuando se reconstituye con solución salina. Basándose en estudios clínicos, se ha mostrado que el uso de Abraxane<sup>®</sup> se caracteriza por reducidas reacciones de hipersensibilidad en comparación con Taxol<sup>®</sup>. Por consiguiente, no se requiere premedicación para pacientes que reciben Abraxane<sup>®</sup>.

Otra ventaja de la formulación de nanopartículas de albúmina es que excluyendo emulsionantes tóxicos es posible administrar mayores dosis de paclitaxel a intervalos más frecuentes que lo que actualmente es posible con Taxol<sup>®</sup>. Existe la posibilidad de que pudiera observarse eficacia potenciada en tumores sólidos como consecuencia de (i) mayores dosis tolerables (300 mg/m<sup>2</sup>), (ii) mayor semivida, (iii) disponibilidad para el tumor local prolongada y/o (iv) liberación *in vivo* sostenida. Abraxane<sup>®</sup> reduce las reacciones de hipersensibilidad, a la vez que mantiene o mejora el efecto quimioterapéutico del fármaco.

La proteína ácida secretada rica en cisteínas (SPARC), también conocida como osteonectina, es una glucoproteína matricelular que facilita la actividad de Abraxane<sup>®</sup>. SPARC tiene afinidad por una amplia variedad de ligandos que incluyen cationes (por ejemplo, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>), factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)), proteínas de la matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, colágeno I-V y colágeno IX, vitronectina y trombospondina-1), células endoteliales, plaquetas, hidroxipapatita y, lo que es más importante para la presente solicitud, albúmina. La expresión de SPARC está regulada por el desarrollo y se expresa predominantemente en tejidos que experimentan remodelación durante el desarrollo normal o en respuesta a lesión (véase, por ejemplo, Lane y col., FASEB J., 8, 163-173 (1994)). Altos niveles de la proteína SPARC se expresan en huesos y dientes en desarrollo. SPARC también está regulada por incremento en varios cánceres agresivos, pero está ausente de la gran mayoría de los tejidos normales (Porter y col., J. Histochem. Cytochem., 43, 791(1995) y véase más adelante). De hecho, la expresión de SPARC se induce entre una variedad de tumores (por ejemplo, vejiga, hígado, ovario, riñón, intestino y mama).

Los documentos de la técnica anterior más relacionada son los documentos WO 2004/064785, WO 2006/058425 y WO 2008/000079. El documento WO 2004/064785 se refiere generalmente a composiciones y procedimientos para sensibilizar a terapia contra el cáncer. El documento WO 2006/058425 se refiere generalmente a ácidos nucleicos de oligonucleótidos o péptidos, matrices, células, procedimientos y kits para determinar una resistencia o sensibilidad a cáncer a una pauta terapéutica. El documento WO 2008/000079 se refiere generalmente a composiciones y procedimientos de uso de la misma para sensibilización a terapia contra el cáncer. Tai, I.T. y col. (J. Clin. Invest. (2005):115(6); pág. 1492-1502) generalmente describen el efecto inversor de la resistencia del polipéptido SPARC sobre tumores resistentes a terapia. Desai N. y col. (Breast Cancer Research and Treatment, vol. 88, n° supl. 1, 2004, páginas S26-S27) desvelan generalmente que algunos tumores agresivos tales como tumores de mama expresan en exceso SPARC y comparan paclitaxel unido a albúmina (ABX) en forma de nanopartícula con Taxol en estos contextos. Gradishar W.J. (Expert Opinion on Pharmacotherapy (2006):7(8); pág. 1041-53) desvela una formulación de paclitaxel sin disolvente para el tratamiento de cáncer de mama metastásico.

Sigue existiendo la necesidad de mejores procedimientos para tratar tumores humanos y de otros mamíferos, además de otros trastornos proliferativos, hiperplásicos, de remodelación e inflamatorios.

**Breve resumen de la invención**

La invención proporciona composiciones para tratar un tumor de mamífero que comprende un polipéptido SPARC, un inhibidor de la angiogénesis y paclitaxel unido a albúmina, opcionalmente con un vehículo adecuado. Además, la divulgación proporciona procedimientos para tratar un tumor de mamífero que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de esta composición

En realizaciones preferidas, el paclitaxel unido a albúmina es un paclitaxel unido a albúmina con el 50% del paclitaxel en forma de nanopartícula. En realizaciones preferidas, el inhibidor de la angiogénesis es Avastin, Sutent o

sorafenib.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIG. 1 representa la unión competitiva de SPARC a albúmina.
- La FIG. 2 ilustra la tinción de albúmina y SPARC en xenoinjertos de tumor MX 1.
- La FIG. 3 representa la transcitosis de paclitaxel a través de monocapas de células endoteliales.
- 10 La FIG. 4 compara el crecimiento de xenoinjertos de tumor comparando células cancerosas que expresan o que no expresan SPARC natural (SEC ID N°: 1) en presencia o ausencia de Abraxane®.
- La FIG. 5A compara el crecimiento de xenoinjertos de tumor en presencia o ausencia de SPARC natural exógena (SEC ID N°: 1) y en presencia o ausencia de 5-fluorouracilo.
- 15 La FIG. 5A compara el cambio de peso de ratones en presencia o ausencia de SPARC natural exógena (SEC ID N°: 1) y en presencia o ausencia de 5-fluorouracilo.
- 20 La FIG. 6 representa el efecto dependiente de la concentración de SPARC sobre la neoangiogénesis.
- La FIG. 7 compara el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de mama en presencia o ausencia de SPARC natural exógena (SEC ID N°: 1) en presencia o ausencia del inhibidor de la angiogénesis Avastin y en presencia o ausencia de Abraxane®.
- 25 La FIG. 8 compara el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de mama en presencia o ausencia de SPAC mutante Q3 exógena (SEC ID N°: 3) en presencia o ausencia del inhibidor de la angiogénesis Avastin y en presencia o ausencia de Abraxane®.
- 30 La FIG. 9 compara el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de colon en presencia o ausencia de SPARC natural exógena (SEC ID N°: 1), en presencia o ausencia del inhibidor de la angiogénesis Avastin y en presencia o ausencia de Abraxane®.
- La FIG. 10 compara el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de colon en presencia o ausencia de SPAC mutante Q3 exógena (SEC ID N°: 3), en presencia o ausencia del inhibidor de la angiogénesis Avastin y en presencia o ausencia de Abraxane®.
- 35 La FIG. 11 compara el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de colon en presencia o ausencia de SPAC mutante Q3 exógena (SEC ID N°: 3), en presencia o ausencia de Sutent como un inhibidor de la angiogénesis y en presencia o ausencia de Abraxane®.
- 40

### Descripción detallada de la invención

#### I. Composiciones terapéuticas y procedimientos

45

Aunque no se desea quedar ligado a teoría alguna particular, la eficacia de los aspectos de la invención empleando inhibidor de la angiogénesis puede estar relacionada con los hallazgos inesperados y sorprendentes de los inventores de que la actividad angiogénica de SPARC exógena varía de un modo dependiente de la concentración de pro-angiogénica a antiangiogénica y que, a bajas concentraciones, la actividad pro-angiogénica de SPARC exógena puede enmascarar sus otras actividades antitumorales. Por tanto, un inhibidor de la angiogénesis puede desenmascarar actividades antitumorales de SPARC basadas en otros mecanismos.

50

El gen SPARC humano codifica una proteína SPARC de 303 aminoácidos, mientras que SPARC madura es una glucoproteína de 285 aminoácidos. Después de la escisión de la secuencia señal se produce una forma secretada de 32 kD que migra a 43 kD sobre SDS-PAGE debido a la glucosilación. La secuencia de aminoácidos de la proteína madura SPARC completa se desvela en SEC ID N°: 1 y la secuencia de ácidos nucleicos de un ARN que codifica una proteína SPARC tal se desvela en SEC ID N°: 2 (presentada como una secuencia de ADNc, es decir, con las uridinas ("U") de ARN como timinas ("T")). Se ha descubierto que una forma alternativa de SPARC, el mutante Q3 (SEC ID N°: 3), tiene una mutación correspondiente a una delección de la tercera glutamina en la forma madura de la proteína SPARC humana. SEC ID N°: 4 es un ácido nucleico que codifica el polipéptido mutante Q3. Véase la patente de EE.UU. n° 7.332.568.

55

60

Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente. La invención proporciona el uso, producción, detección y cuantificación de un polipéptido o proteína SPARC tal como, por ejemplo, un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 ó 3. La invención también proporciona el uso, producción, detección y cuantificación de polipéptido SPARC, en el que el polipéptido

65

comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 10 aminoácidos secuenciales de secuencia SEC ID N°: 1 ó 3, preferentemente al menos aproximadamente 15 aminoácidos secuenciales de secuencia de SEC ID N°: 1 ó 3, más preferentemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos secuenciales de secuencia SEC ID N°: 1 ó 3, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos secuenciales de secuencia SEC ID N°: 1 ó 3. Además, la invención proporciona la detección de un polipéptido SPARC que comprende un polipéptido en el que la secuencia es al menos aproximadamente el 80% idéntica a la secuencia correspondiente de SEC ID N°: 1 ó 3, preferentemente al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia correspondiente de SEC ID N°: 1 ó 3, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica a la secuencia correspondiente de SEC ID N°: 1 ó 3, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 99% idéntica a la secuencia correspondiente de SEC ID N°: 1 ó 3.

Por, por ejemplo “secuencia correspondiente de SEC ID N°: 1” se indica la secuencia que se alinea con la secuencia de SEC ID N°: 1 en la que la región de alineamiento tiene al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, preferentemente tiene al menos aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, e incluso más preferentemente tiene al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. La “secuencia correspondiente de SEC ID N°: 2” se define como la secuencia que se alinea con la secuencia de SEC ID N°: 3 en la que la región de alineamiento tiene al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, preferentemente tiene al menos aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, e incluso más preferentemente tiene al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. Se conocen diversos procedimientos de alineamiento de secuencias en las ciencias de la biotecnología (véanse, por ejemplo, Rosenberg, BMC Bioinformatics 6:278 (2005); Altschul y col., FEBS J. 272(20): 5101-5109 (2005)).

Polipéptidos SPARC adecuados para su uso según la invención también pueden comprender un polipéptido como se describe en el presente documento con identidad de secuencias significativa con SEC ID N°: 1 ó 3 y aproximadamente 5 aminoácidos adicionales, preferentemente aproximadamente 10 adicionales, más preferentemente aproximadamente 25 adicionales, incluso más preferentemente aproximadamente 50 adicionales, o lo más preferentemente aproximadamente 100 aminoácidos adicionales en sus extremos amino y/o carboxilo.

La invención proporciona el uso, clonación, expresión, detección y cuantificación de un ARN de SPARC tal, por ejemplo, un ARN que comprende la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente al ADNc de SEC ID N°: 2 ó 4. La invención también proporciona la detección de ARN de SPARC, en el que el ARN comprende la secuencia nucleica de al menos aproximadamente 15 nucleótidos secuenciales de la secuencia de SEC ID N°: 2 ó 4, preferentemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos secuenciales de la secuencia de SEC ID N°: 2, y más preferentemente al menos aproximadamente 30 nucleótidos secuenciales de la secuencia de SEC ID N°: 2 ó 4. Además, la invención proporciona la detección de un ARN de SPARC que comprende un ácido nucleico en el que la secuencia es al menos aproximadamente el 80% idéntica a la secuencia correspondiente de SEC ID N°: 2 ó 4, preferentemente al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia correspondiente de SEC ID N°: 2 ó 4, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica a la secuencia correspondiente de SEC ID N°: 2 ó 4, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 99% idéntica a la secuencia correspondiente de SEC ID N°: 2 ó 4. Por ejemplo, por “secuencia correspondiente de SEC ID N°: 2” se indica la secuencia que se alinea con la secuencia de SEC ID N°: 2 en la que la región de alineamiento tiene al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, preferentemente tiene al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, más preferentemente tiene al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, incluso más preferentemente tiene al menos aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Se conocen diversos procedimientos de alineamiento de secuencias en las ciencias de biotecnología (véanse, por ejemplo, Rosenberg, BMC Bioinformatics 6:278 (2005); Altschul y col., FEBS J. 272(20): 5101-5109 (2005)). Por ARN de SPARC se indica cualquier ARN de SPARC que incluye, pero no se limita a, un ARNm, ARNnh, transcrito primario o variante de corte y empalme de SPARC.

Por “cantidad terapéuticamente eficaz” se indica una cantidad de una composición que alivia (hasta cierto grado, como se juzga por un médico habitual) uno o más síntomas de la enfermedad o afección en un mamífero. Adicionalmente, por “cantidad terapéuticamente eficaz” de una composición se indica una cantidad que devuelve a normales, tanto parcialmente como completamente, parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados a o causantes de una enfermedad o afección. Un profesional clínico experto en la materia puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición con el fin de tratar o prevenir una condición de enfermedad particular o trastorno cuando se administra, tal como intravenosamente, subcutáneamente, intraperitonealmente, por vía oral o por inhalación. La cantidad precisa de la composición requerida para ser terapéuticamente eficaz dependerá de numerosos factores, por ejemplo, tal como la actividad específica del agente activo, el dispositivo de administración empleado, características físicas del agente, fin de la administración, además de muchas consideraciones

específicas del paciente. Pero, está dentro de la habilidad de un profesional clínico experto habitual tras la apreciación de la divulgación expuesta en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, “la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero a un agente  
 10 quimioterapéutico” se refiere al grado o cantidad que el paciente mejora clínicamente o que el tumor disminuye en tamaño o agresividad debido a un agente quimioterapéutico. Puede decirse que el paciente mejora clínicamente basándose en criterios objetivos tales como, por ejemplo, estado de rendimiento, examen físico, estudios de obtención de imágenes o resultados de pruebas de laboratorio. También puede decirse que el paciente mejora clínicamente basándose en criterios subjetivos informados por el paciente, tales como, por ejemplo, dolor, angustia,  
 15 fatiga o actitud mental. Las disminuciones en el tamaño del tumor pueden basarse en el tumor primario o carga tumoral global medida por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, examen físico, estudio de obtención de imágenes o valor de laboratorio. Por “diminución en el tamaño del tumor” se indica un cambio de al menos aproximadamente el 10%. Además, se desea que esté presente un cambio de al menos aproximadamente el 20%, preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 25%, más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 33%, más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 50%, más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 90%, más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 95%, y lo más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 99%. Por  
 20 disminución en la “agresividad del tumor” se indica, por ejemplo, una reducción del grado histológico, % de células viables en el tumor, % de células proliferantes en el tumor, la invasividad del tumor, la capacidad del tumor para metastatizar u otra métrica de agresividad del tumor conocida en la materia. Por “diminución en la agresividad del tumor” se indica un cambio de al menos aproximadamente el 10% en un parámetro medible relacionado con la agresividad del tumor que es comúnmente usado por aquellos expertos habituales en las ciencias médicas, por ejemplo, sin limitación, fase, grado, carga tumoral, grado de diseminación metastásica, vascularidad, contenido de ADN y fracción proliferativa. Además, se desea que esté presente un cambio de al menos aproximadamente el 20%,  
 25 preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 25%, más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 33%, más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 50%, más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 90%, más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 95%, y lo más preferentemente un cambio de al menos aproximadamente el 99% en un parámetro medible relacionado con la agresividad del tumor que comúnmente es usado por aquellos expertos habituales en las ciencias médicas. La invención también proporciona un procedimiento para predecir o determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno. El procedimiento comprende (a) aislar una muestra biológica del ser humano u otro mamífero, (b) detectar la expresión de la proteína SPARC en la muestra biológica, y (c) cuantificar la cantidad de la proteína SPARC en la muestra biológica. Una vez se determina la cantidad de SPARC expresada por el tumor, la  
 30 eficacia del agente quimioterapéutico puede predecirse o determinarse, por ejemplo, estableciendo una correlación entre la expresión de SPARC y la dosificación de agente terapéutico administrada. La invención también proporciona el uso de anticuerpo producido contra SPARC como agente terapéutico, o un agente de obtención de imágenes para enfermedades en las que SPARC desempeña una función dominante y se expresa en exceso con respecto a tejidos normales.

40 Los términos “tratar”, “tratamiento”, “terapia” y “tratamiento terapéutico” como se usan en el presente documento se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica o terapia preventiva. Un ejemplo de “terapia preventiva” es la prevención o reducción de la posibilidad de una enfermedad elegida como diana (por ejemplo, cáncer u otra enfermedad proliferativa) o afección relacionada con la misma. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la enfermedad o afección, además de aquellos propensos a tener que prevenir la enfermedad o afección. Los términos “tratar”, “tratamiento”, “terapia” y “tratamiento terapéutico” como se usan en el presente documento también describen la gestión y el cuidado de un mamífero con el fin de combatir una enfermedad, o afección relacionada, e incluyen la administración de una composición para aliviar los síntomas, efectos secundarios u otras complicaciones de la enfermedad, afección. El tratamiento terapéutico para el cáncer incluye, pero no se limita a, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia génica e inmunoterapia.

55 Como se usa en el presente documento, el término “agente” o “fármaco” o “agente terapéutico” se refiere a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos de animal (particularmente de mamífero) que se sospecha que tiene propiedades terapéuticas. El agente o fármaco puede purificarse, purificarse sustancialmente o purificarse parcialmente. Un “agente”, según la presente invención, también incluye un agente de radioterapia. Como se usa en el presente documento, el término “agente quimioterapéutico” se refiere a un agente con actividad contra el cáncer, enfermedades neoplásicas y/o proliferativas.

60 La invención proporciona composiciones en las que uno cualquiera o todos del polipéptido SPARC, inhibidor de la angiogénesis y paclitaxel unido a albúmina se liofilizan para la reconstitución junto al lecho del enfermo en formas de dosificación líquidas. Formas de dosificación según la invención incluyen aquellas en la que el polipéptido SPARC, el inhibidor de la angiogénesis y el inhibidor de microtúbulos están incluidos en una forma de dosificación única.

65 Las composiciones proporcionadas por la invención incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 4 ml de líquidos acuosos u orgánicos con una concentración de inhibidor de microtúbulos de

aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml. Tales composiciones pueden tener concentraciones de polipéptidos SPARC de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 400 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, y más preferentemente de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. El inhibidor de la angiogénesis puede estar presente a cualquier concentración adecuada y terapéuticamente eficaz, por ejemplo, Avastin a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona composiciones y procedimientos para tratar un tumor de mamífero que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido SPARC, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de microtúbulos y un inhibidor de la angiogénesis; el polipéptido SPARC es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, 3 o una combinación de las mismas. En realizaciones particularmente preferidas, el polipéptido SPARC es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1.

El polipéptido SPARC se administra a una dosis de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 40 mg por dosis con un ciclo de dosificación de al menos aproximadamente 1 semana. En otras palabras, la dosis de SPARC es de aproximadamente 40 µg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg.

Inhibidores de la angiogénesis adecuados para su uso según la invención incluyen, por ejemplo, un inhibidor de mTOR, Aurora cinasa, un inhibidor de VEGFR cinasa, un inhibidor de PDGFR cinasa, sorafenib, Sutent, axitinib, Avastin, marimastat, bevacizumab, carboxiamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-α, IL-12, factor-4 plaquetario, suramina, SU5416, trombospondina, antagonistas de VEGFR, esteroides angiostáticos, factor inhibidor de la angiogénesis derivado de cartílago, inhibidores de la metaloproteínasa de matriz, angiostatina, endostatina, 2-metoxiestradiol, tecogalan, trombospondina, prolactina, inhibidores de αvβ3, tecogalan, BAY 12-9566, AG3340, CGS27023A, COL-3, vitaxina, ZD0101, TNP-40, talidomida, escualamina, IM862, PTK787, fumagilina, análogos de fumagilina, BB-94, BB-2516, linomida, anticuerpos para factores de crecimiento vasculares, anticuerpos para receptores de factores de crecimiento vasculares o combinaciones de los mismos.

Puede usarse cualquier dosis adecuada de inhibidor de la angiogénesis, por ejemplo, Avastin administrado a una dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana.

Los agentes quimioterapéuticos hidrófobos tienen un HLB (HLB es el número de equilibrio hidrófilo/lipófilo) de 1,0 o menos, preferentemente 2,0 o menos, lo más preferentemente 5,0 o menos, e incluyen, por ejemplo, los agentes epotilona, docetaxel, paclitaxel. Los inhibidores de microtúbulos tales como los taxanos incluyen epotilona, docetaxel, paclitaxel, y combinaciones de los mismos. "Combinaciones de los mismos" se refiere a tanto la administración de formas de dosificación que incluyen más de un fármaco, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel, además de a la administración secuencial, pero temporalmente distinta, de epotilona, docetaxel y paclitaxel (por ejemplo, el uso de docetaxel en un ciclo y paclitaxel en el siguiente). Agentes quimioterapéuticos particularmente preferidos comprenden partículas de fármaco unido a proteína que incluyen, pero no se limitan a, en las que la proteína que constituye las partículas de fármaco unido a proteína comprende albúmina, incluyendo en las que más del 50% del agente quimioterapéutico está en forma de nanopartícula. Lo más preferentemente, el agente quimioterapéutico comprende partículas de paclitaxel unido a albúmina tal como, por ejemplo, Abraxane®.

Formulaciones de nanopartículas adecuadas no se limitan a aquellas que comprenden al menos aproximadamente el 50% del agente activo en forma de nanopartícula. Otras formulaciones de nanopartículas adecuadas comprenden al menos aproximadamente el 60%, preferentemente al menos aproximadamente el 70%, más preferentemente al menos aproximadamente el 80%, o incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 90% del agente activo en forma de nanopartícula. Además, tales formulaciones de nanopartícula pueden comprender lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95% a al menos aproximadamente el 98% del agente activo en forma de nanopartícula.

Procedimientos para tratar un tumor de mamífero según este aspecto preferido de la invención incluyen, sin limitación, aquellos en los que la dosis de paclitaxel es de aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 1000 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de una vez aproximadamente cada semana; preferentemente con una dosis de paclitaxel que es de aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de una vez aproximadamente cada semana; más preferentemente con una dosis de paclitaxel que es de aproximadamente 0,3 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de una vez aproximadamente cada semana; lo más preferentemente con una dosis de paclitaxel que es de aproximadamente 0,01 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 0,3 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de una vez aproximadamente cada semana. Ciclos de dosificación de paclitaxel adecuados también incluyen una vez cada aproximadamente 2 semanas o una vez cada aproximadamente 2 semanas.

Procedimientos para tratar un tumor de mamífero según la invención incluyen, sin limitación, aquellos en los que el polipéptido SPARC se administra antes, con o después del inhibidor de microtúbulos. Similarmente, el inhibidor de la angiogénesis puede administrarse antes, con o después del inhibidor de microtúbulos tal como taxano. Por antes o después se indica una diferencia de tiempo de al menos aproximadamente 2 semanas, preferentemente al menos aproximadamente 1 semana, más preferentemente al menos aproximadamente 3 días, más preferentemente al menos aproximadamente 1 día, más preferentemente al menos aproximadamente 12 horas, más preferentemente al menos aproximadamente 8 horas, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 6 horas, lo más preferentemente al menos aproximadamente 1 hora. Por “sustancialmente simultáneamente” se indica que los dos acontecimientos se producen en el plazo de aproximadamente 3 días, preferentemente en el plazo de aproximadamente 1 día, más preferentemente en el plazo de aproximadamente 12 horas, más preferentemente en el plazo de aproximadamente 8 horas, incluso más preferentemente en el plazo de aproximadamente 6 horas, lo más preferentemente en el plazo de aproximadamente 1 hora.

Las pautas según la invención incluyen una dosis de aproximadamente una vez a la semana en la que:

(a) el polipéptido SPARC es a una dosis de aproximadamente 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 40  $\text{mg}/\text{kg}$  por dosis, el inhibidor de la angiogénesis es Avastin a una dosis de aproximadamente 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 15  $\text{mg}/\text{kg}$  y el inhibidor de microtúbulos es paclitaxel unido a albúmina a una dosis de aproximadamente 30  $\text{mg}/\text{m}^2$  a aproximadamente 1000  $\text{mg}/\text{m}^2$

(b) en la que el polipéptido SPARC es a una dosis de aproximadamente 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 40  $\text{mg}/\text{kg}$  por dosis, el inhibidor de la angiogénesis es Avastin a una dosis de aproximadamente 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 15  $\text{mg}/\text{kg}$  y el inhibidor de microtúbulos es paclitaxel unido a albúmina a una dosis de aproximadamente 1  $\text{mg}/\text{m}^2$  a aproximadamente 30  $\text{mg}/\text{m}^2$  con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana

(c) en la que el polipéptido SPARC es a una dosis de aproximadamente 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 40  $\text{mg}/\text{kg}$  por dosis, el inhibidor de la angiogénesis es Avastin a una dosis de aproximadamente 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 15  $\text{mg}/\text{kg}$  y el inhibidor de microtúbulos es paclitaxel unido a albúmina a una dosis de aproximadamente 0,3  $\text{mg}/\text{m}^2$  a aproximadamente 1  $\text{mg}/\text{m}^2$  con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana

(d) en la que el polipéptido SPARC es a una dosis de aproximadamente 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 40  $\text{mg}/\text{kg}$  por dosis, el inhibidor de la angiogénesis es Avastin a una dosis de aproximadamente 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 15  $\text{mg}/\text{kg}$  y el inhibidor de microtúbulos es paclitaxel unido a albúmina a una dosis de aproximadamente 0,1  $\text{mg}/\text{m}^2$  a aproximadamente 0,3  $\text{mg}/\text{m}^2$  con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana

El polipéptido SPARC en las pautas (a)-(d) puede tener una secuencia que comprende SEC ID N°: 1, 2, o cualquier otra SPARC adecuada y combinaciones de la misma. Estas combinaciones pueden producir una reducción de aproximadamente el 50% en la tasa de crecimiento tumoral en comparación con el inhibidor de microtúbulos tal como taxano solo.

Pueden usarse terapias adicionales con el polipéptido SPARC, inhibidor de la angiogénesis e inhibidor de microtúbulos que incluyen agentes quimioterapéuticos adecuados, por ejemplo, inhibidores de tirosina cinasas (genisteína), agentes biológicamente activos (TNF, de tTF), radionúclidos ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{32}\text{P}$  y otros radionúclidos terapéuticos conocidos), adriamicina, antibióticos de ansamicina, asparaginasa, bleomicina, busulfano, cisplatino, carboplatino, carmustina, capecitabina, clorambucilo, citarabina, ciclofosfamida, camptotecina, dacarbazina, dactinomomicina, daunorubicina, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, etopósido, epotilonas, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiaurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecan, lomustina, mecloretamina, mercaptopurina, melfalan, metotrexato, rapamicina (sirolimus) y derivados, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nitrosurea, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, estreptozocina, tenipósido, tioguanina, tiotepa, taxanos, vinblastina, vincristina, vinorelbina, combretastatinas, discodermolidas y transplatino. Por consiguiente, agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso según la invención incluyen, sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, asparaginasa), antimitóticos (por ejemplo, alcaloide de la vinca), agentes que dañan ADN (por ejemplo, cisplatino), proapoptóticos (agentes que inducen muerte celular programada o apoptosis) (por ejemplo, epipodofilotoxinas), agentes inductores de diferenciación (por ejemplo, retinoides), antibióticos (por ejemplo, bleomicina) y hormonas (por ejemplo, tamoxifeno, dietilestilbestrol). Además, agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso según la invención incluyen agentes antiangiogénicos (inhibidores de la angiogénesis) tales como, por ejemplo, INF-alfa, fumagilina, angiostatina, endostatina, talidomida y similares. “Otros agentes anticancerígenos” también incluyen, sin limitación, polipéptidos biológicamente activos, anticuerpos, lectinas y toxinas. Anticuerpos adecuados para su uso según la invención incluyen, sin limitación, anticuerpos conjugados (acoplados) o sin conjugar (sin acoplar), anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos humanizados o no humanizados, además de fragmentos Fab', Fab o Fab<sub>2</sub>, anticuerpos monocatenarios y similares.

Enfermedades para las que la presente invención es útil incluyen afecciones anormales de proliferación, remodelación de tejido, hiperplasia, cicatrización exagerada en cualquier tejido corporal que incluye tejido blando, tejido conjuntivo, hueso, órganos sólidos, vaso sanguíneo y similares. Ejemplos de enfermedades tratables o diagnosticadas por las composiciones de la invención incluyen cáncer, retinopatía diabética u otra, inflamación,

artritis, reestenosis en vasos sanguíneos o injerto de vasos sanguíneos artificiales o dispositivos intravasculares y similares.

5 La invención también proporciona un modo de transporte de la composición terapéutica a través de la barrera  
 10 endotelial del vaso sanguíneo al intersticio tumoral. El principal obstáculo en la terapia con anticuerpos y la  
 quimioterapia es la translocalización a través de la barrera endotelial en el intersticio tumoral. La albúmina utiliza el  
 mecanismo de transporte del receptor de albúmina para atravesar la barrera endotelial. Este mecanismo de  
 transporte podría ser el mismo que aquellos informados por la bibliografía (gp60 y albondina) o por otros  
 15 mecanismos sin descubrir. Previamente se ha informado de que el agente terapéutico infundido por infusión  
 intravenosa en Y sobre albúmina presentó captación tumoral potenciada (Desai, N. y col. Increased endothelial  
 transcytosis of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) by endothelial gp60 receptors: a pathway inhibited by  
 Taxol®, 27th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) (2004), resumen nº1071). Además, la  
 translocalización potenciada a través de la barrera endotelial puede lograrse usando el mecanismo de transporte de  
 20 albúmina fisiológica (Schnitzer, J.E.; Oh, P. J. Biol. Chem. 269, 6072-6082 (1994).

15 Para moléculas pequeñas tales como, por ejemplo, <1.000-5.000 Dalton, pueden hacerse modificaciones de manera  
 que aumente la afinidad del fármaco por la albúmina. Para formulaciones de moléculas pequeñas puede eliminarse  
 un disolvente que evita la unión del fármaco a la albúmina. Alternativamente, la molécula pequeña puede ligarse a  
 20 albúmina, anticuerpo contra albúmina, fragmentos del mismo o ligandos para un receptor de albúmina tal como se  
 describe más adelante.

25 Para moléculas biológicas tales como proteínas, anticuerpos y fragmentos de los mismos es posible manipular los  
 productos biológicos con un péptido de unión a albúmina de forma que los productos biológicos presenten una  
 afinidad por albúmina. El péptido puede ser tanto una secuencia de unión a albúmina, un anticuerpo o fragmento de  
 anticuerpo contra albúmina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra vehiculos de albúmina (tales como  
 30 gp60/albondina/receptor depurador/o receptor de TGF-beta) como anticuerpo para cualquiera de las proteínas  
 encontradas en las caveolas, el transportador de la albúmina.

30 SPARC puede sintetizarse y purificarse usando tecnologías conocidas. Pueden generarse células que expresan  
 SPARC exógena disponiendo el gen estructural SPARC/ADNc bajo el control de promotor fuerte/inicio de traducción  
 y transfectar el vector en células de mamífero para accionar la expresión de SPARC en estas células.  
 Alternativamente, SPARC puede expresarse usando baculovirus u otros virus tales como adenovirus. SPARC  
 expresado por estas células puede purificarse por procedimientos de purificación tradicional tales como intercambio  
 35 iónico, exclusión por tamaño o cromatografía en C18. SPARC purificada puede formularse en solución salina con  
 conservantes y administrarse intravenosamente, por aerosol, por inyección subcutánea, u otros procedimientos.

40 La invención proporciona además un vector recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que  
 codifica, en el que, por ejemplo, el vector que comprende además un promotor que controla la expresión del  
 polipéptido SPARC que codifica secuencias de ácidos nucleicos. Además, la invención proporciona una célula que  
 comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que la célula es una célula procariota o una  
 célula eucariota. Los procedimientos de cultivo de tejido son muy conocidos para el experto (véase, por ejemplo,  
 Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York  
 (2001), pág. 16,1-16,54). Por consiguiente, la invención proporciona además el procedimiento de preparación del  
 polipéptido de la reivindicación 1 que comprende: (a) transformar células con un ácido nucleico que codifica el  
 45 polipéptido de la reivindicación 1; (b) inducir la expresión del polipéptido por las células transformadas; y (c) purificar  
 el polipéptido.

50 Un polipéptido SPARC puede expresarse y purificarse a partir de una célula huésped recombinante. Células  
 huésped recombinantes pueden ser procariotas o eucariotas que incluyen, pero no se limitan a, bacterias tales como  
*E. coli*, células fúngicas tales como levadura, células de insecto que incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares  
 derivadas de *Drosophila* y de gusano de la seda, y células y líneas celulares de mamífero. Cuando se expresa un  
 polipéptido SPARC en una célula, por ejemplo, una célula humana, tanto si es *in vitro* como *in vivo*, los codones  
 seleccionados para tal polinucleótido que codifica la SPARC pueden optimizarse para un tipo de célula dado (es  
 decir, especie). En la técnica se conocen muchas técnicas para la optimización de codones (véanse, por ejemplo,  
 55 Jayaraj y col., Nucleic Acids Res. 33(9):3011-6 (2005); Fuglsang y col., Protein Expr. Purif. 31(2):247-9 (2003); Wu y  
 col., "The Synthetic Gene Designer: a Flexible Web Platform to Explore Sequence Space of Synthetic Genes for  
 Heterologous Expression", csbw, 2005 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference--Workshops  
 (CSBW'05), pág. 258-259 (2005)).

60 La invención proporciona además construcciones de ácido nucleico que comprenden elementos de control y una  
 molécula de ácidos nucleicos del polipéptido SPARC descrita en el presente documento operativamente ligada a los  
 elementos de control (por ejemplo, un promotor adecuado) para la expresión de un polipéptido SPARC o un  
 polipéptido en el presente documento descrito con cambios de aminoácidos conservativos en un polipéptido SPARC.  
 La expresión de proteínas depende del nivel de transcripción de ARN, que a su vez es regulada por señales de  
 65 ADN. Similarmente, la traducción de ARNm requiere, como mínimo, un codón de iniciación de ATG, que está  
 normalmente localizado dentro de 10 a 100 nucleótidos del extremo 5' del mensajero. Se ha mostrado que las

secuencias que flanquean el codón iniciador de ATG influyen en su reconocimiento por ribosomas eucariotas, conforme a una secuencia consenso de Kozak perfecta que produce la traducción óptima (véase, por ejemplo, Kozak, J. Molec. Biol. 196: 947-950 (1987)). Por tanto, la expresión satisfactoria de un ácido nucleico exógeno en una célula puede requerir la modificación pos-traducciona de una proteína resultante. Por consiguiente, la invención proporciona plásmidos que codifican polipéptidos SPARC en los que el vector es, por ejemplo, pcDNA3.1 o un derivado del mismo, y que incluyen, pero no se limitan a, el plásmido pVT1000Q3 desvelado en el presente documento.

Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento comprenden preferentemente una región codificante operativamente ligada a un promotor adecuado, promotor que es preferentemente funcional en células eucariotas. En la invención pueden usarse promotores víricos tales como, sin limitación, el promotor del RSV y el promotor tardío principal del adenovirus. Promotores no víricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la fosfoglucoquinasa (PGK) y el promotor del factor de elongación 1.alfa. Los promotores no víricos son deseablemente promotores humanos. Elementos genéticos adecuados adicionales, muchos de los cuales se conocen en la técnica, también pueden ligarse a, unirse a o insertarse en el ácido nucleico inventivo y construcciones para proporcionar funciones adicionales, nivel de expresión o patrón de expresión. También pueden usarse promotores nativos para la expresión de los genes de la familia SPARC, en cuyo caso no se usan preferentemente en el cromosoma que los codifica naturalmente, a menos que se modifiquen mediante un procedimiento que cambia sustancialmente ese cromosoma. Tales cromosomas sustancialmente cambiados pueden incluir cromosomas transfectados y alterados por un vector retrovírico o procedimiento similar. Alternativamente, tales cromosomas sustancialmente cambiados pueden comprender un cromosoma artificial tal como HAC, YAC o BAC.

Además, las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento pueden ligarse operativamente a potenciadores para facilitar la transcripción. Potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis que estimulan la transcripción de genes adyacentes. Ejemplos de potenciadores que confieren un alto nivel de transcripción sobre genes ligados en varios tipos diferentes de células de muchas especies incluyen, sin limitación, los potenciadores de SV40 y el RSV-LTR. Tales potenciadores pueden combinarse con otros potenciadores que tienen efectos específicos para el tipo de célula, o puede usarse cualquier potenciador solo.

Para optimizar la producción de proteínas, la molécula de ácido nucleico inventiva puede comprender adicionalmente un sitio de poliadenilación tras la región codificante de la molécula de ácido nucleico. Por tanto, preferentemente todas las señales de transcripción apropiadas (y señales de traducción, cuando corresponda) estarán correctamente dispuestas de forma que el ácido nucleico exógeno se exprese apropiadamente en las células en las que se introduce. Si se desea, el ácido nucleico exógeno también puede incorporar sitios de corte y empalme (es decir, sitios de aceptores de corte y empalme y de donantes de corte y empalme) para facilitar la producción de ARNm, a la vez que se mantiene un transcrito de longitud completa en marco. Además, las moléculas de ácidos nucleicos inventivas pueden comprender adicionalmente las secuencias apropiadas para el procesamiento, secreción, localización intracelular y similares.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden insertarse en cualquier vector adecuado. Vectores adecuados incluyen, sin limitación, vectores víricos. Vectores víricos adecuados incluyen, sin limitación, vectores retrovíricos, vectores alfavíricos, de la variolovacuna, adenovíricos, víricos adenoasociados, víricos del herpes y víricos de la viruela aviar. Los vectores tienen preferentemente una capacidad nativa o manipulada para transformar células eucariotas, por ejemplo, células 293. Adicionalmente, los vectores útiles en el contexto de la invención puede ser vectores de ácido nucleico "desnudo" (es decir, vectores que tienen poca o ninguna proteína, azúcar y/o lípido que los encapsula) tal como plásmidos o episomas, o los vectores pueden complejarse con otras moléculas. Otras moléculas que pueden combinarse adecuadamente con los ácidos nucleicos inventivos incluyen, sin limitación, envueltas víricas, lípidos catiónicos, liposomas, poliaminas, partículas de oro y restos que eligen diana tales como ligandos, receptores o anticuerpos que eligen moléculas celulares como diana.

Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento pueden transformarse en cualquier célula adecuada, normalmente una célula eucariota tal como, por ejemplo, HEK, 293 o BHK, produciendo deseablemente la expresión de un polipéptido SPARC tal como, por ejemplo, el polipéptido que comprende SEC ID N°: 2 o una variante del mismo como se describe en el presente documento. La célula puede cultivarse para proporcionar la expresión de la molécula de ácido nucleico y, por tanto, la producción del polipéptido SPARC tal como, por ejemplo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2 o una variante del mismo como se describe en el presente documento.

Por tanto, la invención proporciona una célula transformada o transfectada con una molécula de ácido nucleico inventiva descrita en el presente documento. Medios de transformación o transfección de células con moléculas de ADN exógeno son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, sin limitación, una molécula de ADN se introduce en una célula usando técnicas de transformación o transfección convencionales muy conocidas en la técnica tales como transfección mediada por fosfato de calcio o DEAE-dextrano, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas y microinyección directa (véase, por ejemplo, Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001), pág. 1.1-1.162, 15.1-15.53, 16.1-16.54). Un

procedimiento ampliamente usado para la transformación es la transfección mediada por tanto fosfato de calcio como DEAE-dextrano. Dependiendo del tipo de célula, hasta el 20% de una población de células cultivadas puede transfectarse en cualquier momento.

5 Otro ejemplo de un procedimiento de transformación es el procedimiento de fusión de protoplastos; los protoplastos derivados de bacterias que llevan altos números de copias de un plásmido de interés se mezclan directamente con células de mamífero cultivadas. Después de la fusión de las membranas celulares (normalmente con polietilenglicol), el contenido de las bacterias se administra al citoplasma de las células de mamífero y el ADN de plásmido se transfiere al núcleo. La fusión de protoplastos no es tan eficiente como la transfección para muchas de las líneas celulares que comúnmente se usan para ensayos de expresión transitoria, pero es útil para líneas celulares en las que la endocitosis de ADN se produce ineficientemente. La fusión de protoplastos frecuentemente da múltiples copias de ADN de plásmido integradas al azar en el cromosoma huésped.

15 La electroporación, la aplicación de breves pulsos eléctrico de alto voltaje a una variedad de células de mamífero y vegetales, conduce a la formación de poros de tamaño nanométrico en la membrana plasmática. El ADN es directamente llevado al citoplasma celular tanto a través de estos poros como a consecuencia de la redistribución de los componentes de la membrana que acompaña el cierre de los poros. La electroporación puede ser extremadamente eficiente y puede usarse tanto para la expresión transitoria de genes de clones como para el establecimiento de líneas celulares que llevan copias integradas del gen de interés.

20 La transformación de liposomas implica la encapsulación de ADN y ARN dentro de liposomas, seguido de fusión de los liposomas con la membrana celular. Además, el ADN que está recubierto con un lípido catiónico sintético puede introducirse en células por fusión. Alternativamente, en la transfección puede usarse polietilenimina (PEI) lineal y/o ramificada.

25 La microinyección directa de una molécula de ADN en núcleos tiene la ventaja de no exponer la molécula de ADN a compartimentos celulares tales como endosomas de bajo pH. Por tanto, la microinyección se usa principalmente como un procedimiento para establecer líneas de células que llevan copias integradas del ADN de interés.

30 Tales técnicas pueden usarse para la transformación tanto estable como transitoria de células eucariotas. El aislamiento de células establemente transformadas requiere la introducción de un marcador de selección conjuntamente con la transformación con el gen de interés. Tales marcadores de selección incluyen genes que confieren resistencia a neomicina, además del gen HPRT en células negativas para HPRT. La selección puede requerir cultivo prolongado en medios de selección, al menos durante aproximadamente 2-7 días, preferible durante al menos aproximadamente 1-5 semanas (véase, por ejemplo, Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001), pág. 16.1-16.54).

40 Las secuencias de ácidos nucleicos para su uso en la presente invención también pueden producirse en parte o en total por síntesis química, por ejemplo, por el procedimiento de fosforamido descrito por Beaucage, y col. (*Tetra. Letts.* 22: 1859-1862 (1987)) o el procedimiento de triéster (Matteucci y col., *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3185 (1981)), que pueden realizarse en sintetizadores de oligonucleótidos automatizados comerciales. Puede obtenerse un fragmento bicatenario a partir del producto monocatenario de síntesis química tanto sintetizando la cadena complementaria como hibridando las cadenas juntas bajo condiciones apropiadas como sintetizando la cadena complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia de cebador apropiada.

45 El polipéptido SPARC puede prepararse por cualquier procedimiento recombinante adecuado que comprende un vector manipulado para expresar en exceso SPARC exógena. Cualquier célula adecuada, que incluye células de bacteria, levadura, insectos o de mamífero, puede transfectarse para expresar SPARC. 293 de mono verde africano son las células de mamífero preferidas para la expresión de SPARC exógena. Aunque puede usarse cualquier sistema de cultivo adecuado, un sistema de células de fibra hueca es un sistema de cultivo preferido para la producción de SPARC.

50 Como SPARC es secretada, puede aislarse de los medios del siguiente modo: (a) los medios acondicionados se recogen dos veces al día del biorreactor (por ejemplo, 100 ml / cartucho grande); (b) los medios se centrifugan y se filtran a través de filtro de 0,22 micrómetros; el pH del filtrado se ajusta a 7,8 antes de la carga sobre la columna de afinidad. Sorprendentemente, se ha encontrado que el suero protege SPARC secretada de la degradación, siendo el 3% de suero una concentración suficiente para proporcionar esta protección.

60 Puede usarse cualquier procedimiento de purificación adecuado. Por ejemplo, una columna de afinidad de Ni es ideal para SPARC marcada con histidina. Primero, la columna se equilibra con Na-P 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,8. Entonces, la muestra se carga y la columna se lava con el mismo tampón hasta la referencia. La columna se lava con el mismo tampón, pero con pH 6,0 hasta la referencia. Esto va seguido de lavado con el mismo tampón, pero con pH 5,3 hasta la referencia. La proteína unida se eluye con gradiente de imidazol del siguiente modo: (a) la columna se lava con 2 volúmenes de columna de tampón A (1X PBS, NaCl 300 mM, pH 7,9), (b) un gradiente de hasta el 10% de tampón B (1X PBS, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 7,9) se aplica durante hasta 10 volúmenes de columna, (c) un gradiente de hasta el 100% de tampón B se usa para eluir cualquier proteína unida. Las

fracciones de pico del gradiente de imidazol se analizaron por transferencia Western

La cromatografía de intercambio iónico Mono-Q se usa opcionalmente para más purificación. Fracciones que contienen SPARC de la columna de Ni se reúnen y luego se concentran y el tampón se cambia usando Amicon Centricon a MOPS 20 mM, LiCl<sub>2</sub> 200 mM, pH 6.5. Esta muestra se carga sobre la columna Mono-Q que se equilibra previamente con el mismo tampón. La proteína unida se eluye con gradiente lineal de Mops 20 mM, LiCl<sub>2</sub> 200 mM, pH 6,5

Después de cada cromatografía en columna, las fracciones que contienen SPARC se analizan por transferencia Western. Las fracciones reunidas que contienen SPARC se concentran adicionalmente y el tampón se cambia usando Amicon Centricon (es decir, después de la columna de Ni, el tampón se cambia por la columna Mono-Q, y PBS después de la purificación en Mono-Q). Esta proteína purificada se analiza por SDS-PAGE y las bandas se barrieron para pureza. El nivel de endotoxina se determina por un procedimiento colorimétrico.

En ciertas realizaciones bacterianas, cuando se expresa y se purifica un polipéptido SPARC, se emplean técnicas para mejorar la solubilidad de proteínas para evitar la formación de cuerpos de inclusión bacterianos (que son fracciones insolubles) y, por tanto, obtener grandes cantidades del polipéptido. SPARC acumulada en cuerpos de inclusión es una SPARC de tipo inactivo que no retiene sus actividades fisiológicas.

La solubilidad de un polipéptido SPARC purificado puede mejorarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la solubilidad también puede mejorarse expresando un fragmento funcional, pero no el polipéptido SPARC de longitud completa. Además, para aumentar la solubilidad de una proteína expresada (por ejemplo, en *E. coli*), puede reducirse la tasa de síntesis de proteínas reduciendo la temperatura de crecimiento, usando un promotor más débil, usando un plásmido de menor número de copias, reduciendo la concentración de inductor, cambiando el medio de crecimiento como se describe en Georgiou & Valax (Current Opinion Biotechnol. 7:190-197 (1996)). Esto disminuye la tasa de síntesis de proteínas y normalmente se obtiene proteína más soluble. También pueden añadirse grupos prostéticos o co-factores que son esenciales para el apropiado plegamiento o para la estabilidad de proteínas, o añadir tampón para controlar la fluctuación del pH en el medio durante el crecimiento, o añadir 1% de glucosa para reprimir la inducción del promotor lac por lactosa, que está presente en la mayoría de los medios enriquecidos (tales como LB, 2xYT). También pueden añadirse polioles (por ejemplo, sorbitol) y sacarosa a los medios debido a que el aumento en la presión osmótica producida por estas adiciones conduce a la acumulación de osmoprotectores en la célula, que estabilizan la estructura de la proteína nativa. Puede añadirse etanol, tioles de bajo peso molecular y disulfuros, y NaCl. Además, pueden co-expresarse chaperonas y/o foldasas con el polipéptido deseado. Las chaperonas moleculares promueven la apropiada isomerización y la elección de diana celular interactuando transitoriamente con productos intermedios de plegamiento. Los sistemas de chaperonas de *E. coli* incluyen, pero no se limitan a: GroES-GroEL, DnaK-DnaJ-GrpE, ClpB.

Las foldasas aceleran las etapas limitantes de la velocidad a lo largo de la ruta de plegamiento. Tres tipos de foldasas desempeñan una función importante: peptidil prolil cis/trans isomerasas (PPI), disulfuro oxidoreductasa (DsbA) y disulfuro isomerasa (DsbC), siendo la proteína disulfuro isomerasa (PDI) una proteína eucariota que cataliza tanto la oxidación de proteína cisteína como la isomerización de enlaces disulfuro. La co-expresión de una o más de estas proteínas con la proteína diana podría conducir a mayores niveles de proteína diana soluble.

Un polipéptido SPARC puede producirse como una proteína de fusión con el fin de mejorar su solubilidad y producción. La proteína de fusión comprende un polipéptido SPARC y un segundo polipéptido fusionados juntos en marco. El segundo polipéptido puede ser un componente de fusión conocido en la técnica por mejorar la solubilidad del polipéptido con el que está fusionado, por ejemplo, marca de polihistidina, NusA, bacterioferritina (BFR), GrpE, tiorredoxina (TRX) y glutatión-S-transferasa (GST). Novagen Inc. (Madison, Wis.) proporciona la serie de vectores pET 43.1 que permiten la formación de una fusión NusA-diana. DsbA y DsbC también han mostrado efectos positivos sobre niveles de expresión cuando se usan como un componente de fusión; por tanto, pueden usarse para fusionarse con un polipéptido SPARC para conseguir mayor solubilidad.

En una realización, un polipéptido SPARC se produce como un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido SPARC y un componente de fusión tiorredoxina, como se describe en la patente de EE.UU. n°: 6.387.664, incorporada por este documento por referencia en su totalidad. La fusión de tiorredoxina-SPARC puede producirse en *E. coli* como una proteína soluble fácil de formular en una gran cantidad sin perder las actividades fisiológicas. Aunque la patente de EE.UU. n°: 6.387.664 proporciona una proteína SPARC de fusión con SPARC fusionada con el extremo C de tiorredoxina, se entiende, con el fin de la presente invención, que un polipéptido SPARC puede fusionarse tanto con el extremo N como con el extremo C de un segundo polipéptido, mientras que se retenga su función sensibilizante.

Además de aumentar la solubilidad, una proteína de fusión que comprende un polipéptido SPARC puede construirse para la fácil detección de la expresión del polipéptido SPARC en una célula. En una realización, el segundo polipéptido que se fusiona con el polipéptido SPARC es un polipéptido indicador. El polipéptido indicador, cuando sirve para tal fin de detección, no tiene que fusionarse con el polipéptido SPARC. Puede ser codificado por el mismo polinucleótido (por ejemplo, un vector), que también codifica el polipéptido SPARC y co-introducirse y co-expresarse en una célula diana.

Preferentemente, el polipéptido indicador usado en la invención es una proteína autofluorescente (por ejemplo, GFP, EGFP). Las proteínas autofluorescentes proporcionan un fácil ensayo para la identificación de expresión de un polinucleótido (y el producto de polipéptido) de interés. Debido a que la actividad del polipéptido indicador (y, por inferencia, su nivel de expresión) puede monitorizarse cuantitativamente usando un citómetro de flujo, es simple  
5 ensayar muchos transfectantes independientes tanto secuencialmente como en población voluminosa. Las células con la mejor expresión pueden luego cribarse para o seleccionarse de la población. Esto es útil cuando se selecciona una célula recombinante que comprende un polipéptido o polinucleótido SPARC para tratamiento de sensibilización según la presente invención.

10 La invención proporciona moléculas de SPARC que incluyen polipéptidos y proteínas SPARC conjugadas con polietilenglicol (PEG). La conjugación con PEG puede aumentar la semivida en circulación de una proteína, reducir la inmunogenicidad y antigenicidad de proteínas y mejorar la bioactividad. Puede usarse cualquier procedimiento adecuado de conjugación que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, hacer reaccionar metoxi-PEG con grupos amino disponibles de una proteína SPARC u otros sitios reactivos tales como, por ejemplo, histidinas o cisteínas.  
15 Además, pueden usarse enfoques de ADN recombinante para añadir aminoácidos con grupos reactivos con PEG a las moléculas de SPARC inventivas. El PEG puede procesarse antes de hacerlo reaccionar con la proteína SPARC inventiva, por ejemplo, pueden añadirse grupos de ligador al PEG. Además, según la invención pueden usarse estrategias de PEG-ilación liberable e híbrida tales como, por ejemplo, la PEG-ilación de SPARC de forma que las moléculas de PEG añadidas a ciertos sitios en la molécula de SPARC sean liberadas *in vivo*. Tales procedimientos de conjugación con PEG se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Greenwald y col., Adv. Drug Delivery Rev. 55:217-250 (2003)).

Además, la invención proporciona proteínas SPARC de fusión que incluyen, por ejemplo, sin limitación, secuencias de SPARC que están fusionadas en la dirección 5' o en la dirección 3' de dominios de proteínas diagnósticamente  
25 útiles (tales como hapteno, GFP), dominios de proteínas inmunológicamente activos (por ejemplo, TF o TNF) o dominios de toxina.

Además, la invención proporciona un procedimiento para tratar un tumor u otra enfermedad proliferativa en un mamífero con un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno que comprende: (a) aislar una muestra biológica del mamífero, (b) detectar la expresión de la proteína SPARC o ARN en la muestra biológica, (c) cuantificar la cantidad de la proteína SPARC o ARN en la muestra biológica, (d) determinar si la proteína SPARC o ARN está presente o no a un nivel que indica el uso del agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno, y (e), si, basándose en el nivel de la proteína SPARC o ARN, se indica administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno.  
30

## 35 II. Aspectos de diagnóstico

Por "predecir la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico" se indica hacer un juicio basándose en resultados de prueba combinados con la experiencia  
40 clínica, considerando la probabilidad de una respuesta antes administrar el agente quimioterapéutico. Por "determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero a un agente quimioterapéutico" se indica hacer un juicio basándose en resultados de prueba combinados con la experiencia clínica, considerando la probabilidad de una respuesta después de administrar el agente quimioterapéutico, pero antes de que la respuesta pueda determinarse clínicamente o por estudios de laboratorio o de obtención de imágenes convencionales conocidos para aquellos expertos habituales en las ciencias médicas. Por tumor se indica una proliferación clónica de células que pueden o pueden no tener propiedades malignas (por ejemplo, sin limitación, la capacidad para inducir angiogénesis, invadir, estar libre de contacto o isquemia o crecimiento inhibido, metastatizar o tener reparación de ADN alterada).  
45

50 Como se usa en el presente documento, los términos "resistente" o "resistencia a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno" se refiere a una resistencia adquirida o natural de una muestra de cáncer o un mamífero a una terapia, es decir, que es no sensible a o que tiene respuesta reducida o limitada al tratamiento terapéutico, por ejemplo, que tiene una respuesta reducida a un tratamiento terapéutico del 25% o más. Además, la resistencia también puede indicarse por una respuesta reducida de, por ejemplo, el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o más, a 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más. La reducción en la respuesta se mide comparando con la misma muestra de cáncer o mamífero antes de adquirirse la resistencia, o comparando con una muestra de cáncer diferente o un mamífero que se sabe que no tiene resistencia al tratamiento terapéutico. Como se usa en el presente documento, los términos "sensible" o "sensible a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno" se refieren a la ausencia de resistencia.  
55

60 La invención proporciona procedimientos para predecir o determinar la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno, procedimiento que comprende las etapas de (a) aislar una muestra biológica del mamífero, (b) detectar la expresión de la proteína SPARC o ARN en la muestra biológica, y (c) cuantificar la cantidad de la proteína SPARC en la muestra biológica. El procedimiento puede usarse según otro aspecto y relacionado de la invención en el que la proteína SPARC o ARN se expresa en exceso o se expresa en defecto en el tumor con respecto al tejido normal correspondiente. Por "tejido  
65

normal correspondiente” se indica el tejido, en ausencia de tumor, en el que el tumor primario se desarrolla o el tejido que, en ausencia de tumor, contiene el tipo de células o citoblastos que han sido transformadas o mutadas de manera que recibe las células neoplásicas del tumor. La invención proporciona realizaciones en las que la muestra biológica se aísla del tumor (o tejido implicado en una enfermedad proliferativa) o de un líquido corporal tal como, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero u orina. La invención proporciona además un procedimiento para predecir o determinar la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno, en el que el mamífero es un ser humano.

Además, la invención proporciona un procedimiento para tratar un tumor u otra enfermedad proliferativa en un mamífero con un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno que comprende (a) aislar una muestra biológica del mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano, (b) detectar la expresión de la proteína SPARC o ARN en la muestra biológica, (c) cuantificar la cantidad de la proteína SPARC o ARN en la muestra biológica, (d) determinar si la proteína SPARC o ARN está presente a un nivel que indica que un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno debe administrarse, y (e), si, basándose en el nivel de proteína SPARC o ARN, se indica administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno. En particular, la invención proporciona procedimientos para tratar un tumor de mamífero que comprende terapia de combinación con SPARC y paclitaxel unido a albúmina.

Además, la invención proporciona un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero tal como, por ejemplo, un tumor humano u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno que comprende un medio para el aislamiento de la proteína del tumor, un medio de detección y cuantificación de la proteína SPARC, proteínas de control y regla para predecir la respuesta del tumor. La invención también proporciona un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno que comprende un medio para el aislamiento de ARN del tumor, un medio de detección y cuantificación de ARN de SPARC, ARN de control y reglas para predecir la respuesta del tumor basándose en el nivel de ARN de SPARC en el tumor.

La invención también proporciona un procedimiento para predecir o determinar la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico, además de un procedimiento para tratar un tumor de mamífero con un agente quimioterapéutico, en el que el agente quimioterapéutico es, por ejemplo, epotilona, docetaxel, paclitaxel (tal como Abraxane<sup>®</sup>) o combinaciones de los mismos. La invención proporciona además realizaciones en las que la predicción de la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico guarda una correlación positiva o negativa con niveles de SPARC.

Además, la invención proporciona un procedimiento para administrar un agente quimioterapéutico a un tumor en el mamífero, en el que el procedimiento comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende un agente quimioterapéutico acoplado a una proteína SPARC que puede unirse a albúmina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones inventivas pueden comprender moléculas pequeñas, moléculas grandes o proteínas.

Por “determinar si la proteína SPARC o ARN está presente a un nivel que indica el uso del agente quimioterapéutico” se indica que el nivel cuantificado de la proteína SPARC o ARN que está presente en el espécimen del mamífero con un tumor es suficientemente alto basándose en datos de correlación histórica de comparación del nivel de SPARC y la respuesta a tratamiento para indicar que puede esperarse razonablemente que el tumor responda al agente quimioterapéutico. Por “indicar” o “indicado” se indica que, en vista del nivel de SPARC y basándose en el criterio médico razonable, el agente quimioterapéutico debería usarse. Por ejemplo, sin limitación, puede hacerse una biopsia de un tumor para inmunohistología con anticuerpos anti-SPARC preparando una fina sección de la biopsia sobre un portaobjetos de microscopio. Entonces, el portaobjetos de biopsia se tiñe usando un protocolo inmunohistológico anti-SPARC (véase, por ejemplo, Sweetwyne y col., J. Histochem. Cytochem. 52(6):723-33 (2004); Tai y col., J. Clin. Invest. 115(6):1492-502 (2005)) simultáneamente con portaobjetos de control que contienen secciones de biopsias con niveles conocidos de SPARC de otros tumores sensibles a y resistentes al agente quimioterapéutico considerado para su uso. Es una práctica común en la materia clasificar la intensidad de la tinción inmunohistológica usando microscopía óptica. El experto en la materia (por ejemplo, un anatomopatólogo) puede asignar, basándose en la comparación con la tinción del portaobjetos de control, una clasificación de tinción (por ejemplo, 0, 1+, 2+, 3+, 4+) a la biopsia de tumor. El tratamiento con el agente quimioterapéutico puede “indicarse” si la tinción de la biopsia de tumor se clasifica en, por ejemplo, 3+ o 4+. Tales comparaciones y asignaciones de clasificaciones de la tinción están perfectamente dentro de la habilidad del médico experto habitual en la materia (por ejemplo, médico, anatomopatólogo, oncólogo, veterinario) que trata mamíferos con tumores.

Los procedimientos requieren una muestra biológica que puede aislarse del tumor o tejidos implicados en una enfermedad proliferativa por cualquier procedimiento adecuado que incluye, sin limitación, resección, biopsia, aspiración, venopunción o combinaciones de los mismos. Alternativamente, los procedimientos requieren una muestra biológica que puede ser de un líquido corporal tal como, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero y orina. Además, muestras biológicas de control o de referencia que incluyen materiales de tumor y de líquido corporal pueden obtenerse de tejidos normales del mismo mamífero, otros individuos libres de tumor o

enfermedad proliferativa o de otros tumores con niveles conocidos de SPARC y que se sabe que son sensibles a o resistentes a un agente quimioterapéutico dado. Adicionalmente, los procedimientos pueden ponerse en práctica cuando el mamífero que padece el tumor o enfermedad proliferativa es un ser humano.

5 Además, la invención proporciona un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno que comprende un medio para el aislamiento de la proteína del tumor, un medio de detección y cuantificación de la proteína SPARC, proteínas de control y reglas para predecir la respuesta del tumor. La invención también proporciona un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno que comprende un medio para el aislamiento de ARN del tumor, un medio de detección y cuantificación de ARN de SPARC, ARN de control y reglas para predecir la respuesta del tumor basándose en el nivel de ARN de SPARC en el tumor. Por ejemplo, la proteína SPARC o ARN en una biopsia de tumor puede “aislarse” disponiendo una fina sección del biopsia de tumor sobre un portaobjetos de microscopio. Cualquier proteína SPARC o ARN presente puede entonces detectarse y cuantificarse por tinción inmunohistológica con un anticuerpo anti-SPARC (véase, por ejemplo, Sweetwyne y col., J. Histochem. Cytochem. 52(6):723-33 (2004); Tai y col., J. Clin. Invest. 115(6):1492-502 (2005)) o hibridación *in situ* usando una sonda de ácido nucleico complementaria al ARN de SPARC (véase, por ejemplo, Thomas y col., Clin. Can. Res. 6:1140-49 (2000)). Al mismo tiempo, portaobjetos de control positivo y negativo se teñirían para proteína SPARC o ARN. El experto en la materia puede usar fácilmente microscopía óptica para clasificar la intensidad de la tinción de la SPARC en la biopsia de tumor (por ejemplo, 0, 1+, 2+, 3+, 4+). El kit inventivo también comprende reglas para predecir la respuesta del tumor basándose en el nivel de la proteína SPARC o ARN en el tumor tal como, por ejemplo, “se indica tratamiento con el agente quimioterapéutico si la tinción de la biopsia del tumor se clasifica en, por ejemplo, 3+ o 4+” o “tumores con tinción 3+ o 4+ tienen una alta tasa de respuesta”. Las reglas específicas referentes a una realización particular de los kits inventivos pueden generarse fácilmente realizando estudios de correlación retrospectiva o prospectiva que son rutinarios en la materia y que no requerirían experimentación adicional.

Por “cuantificación” como se usa en el presente documento se indica determinar la cantidad o concentración presente. La invención proporciona un procedimiento de cuantificación del nivel de la proteína SPARC o ARN en el que la proteína SPARC o ARN se expresa en exceso o se expresa en defecto en el tumor con respecto a tejidos normales que incluye, pero no se limita a, el nivel encontrado en el tejido normal correspondiente de origen del tumor. Alternativamente, la invención proporciona un procedimiento de cuantificación del nivel de la proteína SPARC o ARN en el que la proteína SPARC o ARN se expresa en exceso o se expresa en defecto en el tumor con respecto a otros tumores que incluyen, pero no se limitan a, tumores del mismo tejido o histología. Además, la invención proporciona un procedimiento de cuantificación del nivel de la proteína SPARC o ARN en el que la proteína SPARC o ARN se expresa en exceso o se expresa en defecto en el tumor con respecto a otros tumores que incluyen, pero no se limitan a, tumores que son sensibles a o resistentes a un agente quimioterapéutico o combinación de agentes quimioterapéuticos. Por se expresa en exceso o se expresa en defecto se indica que los niveles de la proteína SPARC o ARN se diferencian entre los dos especímenes o muestras al menos aproximadamente el 5%. Además, se desea que la diferencia entre los dos especímenes o muestras sea al menos aproximadamente el 10%, más preferentemente al menos aproximadamente el 20%, más preferentemente al menos aproximadamente el 50%, más preferentemente al menos aproximadamente el 100%, más preferentemente al menos aproximadamente 3 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 5 veces, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 10 veces.

45 La invención proporciona un procedimiento de cuantificación del nivel de la proteína SPARC o ARN en el que la proteína SPARC o ARN se expresa en exceso o se expresa en defecto en el líquido biológico de prueba con respecto a líquido correspondiente de un paciente sin tumor. Alternativamente, la invención proporciona un procedimiento de cuantificación del nivel de la proteína SPARC o ARN en el que la proteína SPARC o ARN se expresa en exceso o se expresa en defecto en el líquido biológico de prueba con respecto a líquido correspondiente de otro paciente con un tumor que incluye, pero no se limita a, tumores que son sensibles a o resistentes a un agente quimioterapéutico o combinación de agentes quimioterapéuticos. Por se expresa en exceso o se expresa en defecto se indica que los niveles de la proteína SPARC o ARN se diferencian en dos especímenes al menos aproximadamente el 5%. Además, se desea que esté presente una diferencia de al menos aproximadamente el 10%, preferentemente al menos aproximadamente el 20%, más preferentemente al menos aproximadamente el 50%, más preferentemente al menos aproximadamente el 100%, más preferentemente al menos aproximadamente 3 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 5 veces y lo más preferentemente al menos aproximadamente 10 veces.

60 La invención proporciona procedimientos de predicción o determinación de una respuesta de tumor a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno, procedimientos para tratar un tumor y kits para predecir la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno, en el que el tumor está seleccionado del grupo que consiste en tumores de la cavidad bucal, tumores faríngeos, tumores del aparato digestivo, los tumores del aparato respiratorio, tumores óseos, tumores cartilagosos, metástasis óseas, sarcomas, tumores de la piel, melanoma, tumores de mama, los tumores del aparato urinario, tumores de las vías urinarias, tumores orbitales, tumores cerebrales y del sistema nervioso central, gliomas, tumores del sistema endocrino, tumores de tiroides, tumores esofágicos, tumores gástricos, tumores del intestino delgado, tumores colónicos,

tumores rectales, tumores anales, tumores del hígado, tumores de la vesícula biliar, tumores pancreáticos, tumores laríngeos, tumores de pulmón, tumores bronquiales, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de pulmón de células pequeñas, tumores del cuello del útero, tumores del cuerpo uterino, tumores de ovario, tumores de vulva, tumores vaginales, tumores de próstata, carcinoma prostático, tumores testiculares, tumores del pene, tumores de la vejiga urinaria, tumores de riñón, tumores de la pelvis renal, tumores de uréter, tumores de cabeza y cuello, cáncer paratiroideo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica. Además, la invención proporciona procedimientos de predicción o determinación de una respuesta de tumor a un agente quimioterapéutico, procedimientos para tratar un tumor y kits para predecir la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico, en el que el tumor es un sarcoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células basales, carcinoma de células claras, oncitoma o combinaciones de los mismos. Además, la invención proporciona procedimientos de predicción o determinación de una respuesta de tumor a un agente quimioterapéutico, procedimientos para tratar un tumor y kits para predecir la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico, en los que el tumor es un tumor benigno o un tumor maligno. Todavía más, la invención proporciona procedimientos de predicción o determinación de una respuesta de enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico o tratar una enfermedad proliferativa que incluye, pero no se limita a, cuando las enfermedades proliferativas son, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, endometriosis, hiperplasia endometrial, aterosclerosis, psoriasis o una glomerulopatía renal proliferativa. La invención proporciona realizaciones en las que el tumor es en mamífero que incluye, pero no se limita a, cuando el mamífero es un ser humano.

Cualquier muestra biológica adecuada puede aislarse del mamífero en el contexto del procedimiento inventivo y usarse para la detección y cuantificación de polipéptidos y/o ARN. Preferentemente, la muestra biológica se aísla del tumor, tal como por una biopsia de tumor. La muestra biológica se aísla del mamífero usando procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, la muestra biológica puede aislarse de un líquido corporal de mamífero que incluye, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero u orina. En particular, en la técnica se conocen muchas técnicas de purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, pág. 421-696 (1988)).

Cualquier procedimiento adecuado para la detección y cuantificación de una proteína SPARC puede usarse según la invención que incluye, pero no se limita a, el uso de anticuerpos anti-SPARC (por ejemplo, transferencia Western, ELISA) (véase, por ejemplo, Sweetwyne y col., *J. Histochem. Cytochem.* 52(6):723-33 (2004); Tai y col., *J. Clin. Invest.* 115(6):1492-502 (2005)), el uso de proteínas de unión específica a SPARC (por ejemplo, ligandos de SPARC de radiomarca, ensayos similares a ELISA), electroforesis bidimensional, espectroscopía de masas o combinaciones de los mismos (véanse, por ejemplo, Nedelkov D y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(31):10852-7 (2005); Chen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (49):17039-44(2004)). Además, puede usarse inmunohistoquímica para el aislamiento, detección y cuantificación de la proteína SPARC en una muestra (véanse, por ejemplo, Sweetwyne y col., *J. Histochem. Cytochem.* 52(6):723-33 (2004); Tai y col., *J. Clin. Invest.* 115(6):1492-502 (2005)).

La invención proporciona un procedimiento en el que el ARN de SPARC se detecta y se cuantifica. En la técnica se conocen numerosos procedimientos para aislar ARN, tal como los descritos por Chomczynski (patente de EE.UU. nº: 5.945.515) o por DiMartino y col. (*Leukemia* 20(3):426-32 (2006)). Alternativamente, puede aislarse ARN en una forma adecuada para la detección y cuantificación según la invención por la preparación de un portaobjetos de microscopio que contiene una sección de tejido (véase, por ejemplo, Thomas y col., *Clin. Can. Res.* 6:1140-49 (2000)). Puede detectarse y cuantificarse ARN de SPARC por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Thomas y col., *Clin. Can. Res.* 6:1140-49 (2000)), transferencia Northern (véase, por ejemplo, Wrana y col., *Eur. J. Biochem.* 197:519-28 (1991)), RT-PCR en tiempo real (véase, por ejemplo, DiMartino y col., *Leukemia* 20(3):426-32 (2006)), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos en tiempo real (véase, por ejemplo, Landry y col., *J. Clin. Microbiol.* 43(7):3136-9 (2005)), análisis de micromatrices (véase, por ejemplo, Tai y col., *J. Clin. Invest.* 115(6):1492-502 (2005); DiMartino y col., *Leukemia* 20(3):426-32 (2006)) y combinaciones de los mismos.

La invención también proporciona un procedimiento para predecir o determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno en el que la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico guarda una correlación positiva o negativa con niveles de SPARC. Por "guarda una correlación con niveles de SPARC" se indica, por ejemplo, que se detecta una relación mutua o recíproca entre la respuesta del tumor a un agente quimioterapéutico dado y el nivel de la proteína SPARC o ARN. Es decir, la calidad, grado, magnitud o nivel de la respuesta del tumor varía con el nivel del nivel de la proteína SPARC o ARN detectado. Una "correlación positiva" está presente cuando la calidad, grado, magnitud o nivel de la respuesta del tumor aumenta a medida que aumenta el nivel de la proteína SPARC o ARN detectado. Una "correlación negativa" está presente cuando la calidad, grado, magnitud o nivel de la respuesta del tumor disminuye a medida que aumenta el nivel de la proteína SPARC o ARN detectado. La relación entre el nivel de la respuesta del tumor y el nivel de la proteína SPARC o ARN detectado puede adoptar la forma de o aproximarse a una función en escalera, función lineal o función logarítmica. Por "guardar una correlación" se indica establecer una correlación o considerar el impacto de una correlación conocida.

Además, la invención también proporciona un procedimiento para predecir o determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno comparando el nivel de la proteína SPARC o ARN detectado con el detectado en una muestra de referencia conocida. Una muestra de referencia tal puede ser de, por ejemplo, un tejido normal o líquido corporal.

5 Alternativamente, la muestra de referencia puede ser un tumor con un nivel de SPARC conocido, respuesta, sensibilidad o resistencia a un agente quimioterapéutico dado u otro agente anticancerígeno o combinaciones de los mismos.

Además, la respuesta predicha puede caracterizarse como eficaz o como no eficaz tal que se use un agente quimioterapéutico dado o se use un agente quimioterapéutico alternativo. Como tal, la respuesta predicha puede caracterizarse como una relación de la respuesta resultante del uso de un agente quimioterapéutico frente al uso de otro agente quimioterapéutico, por ejemplo, la relación de la respuesta producida por Abraxane® con la producida por Taxotere®.

15 Por consiguiente, la invención proporciona un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico u otro agente anticancerígeno que comprende un medio para el aislamiento de proteína o ARN del tumor, un medio de detección y cuantificación de la proteína SPARC o ARN, proteínas o ARN de control y reglas para predecir la respuesta del tumor. Puede usarse un kit, por ejemplo, sin limitación, para predecir la respuesta de un carcinoma de mama, ovario o cabeza y cuello a un agente quimioterapéutico que comprende nanopartículas de paclitaxel unido a albúmina. En el presente documento se han descrito medios adecuados para aislar proteína o ARN y una detección y cuantificación de la proteína SPARC o ARN. Proteínas de control adecuadas o ARN deben incluir controles positivos tales como, por ejemplo, material tumoral o líquido biológico de un mamífero que lleva tumor o proteína aislada o ARN de material tumor o de un líquido biológico recogido de otro agente anticancerígeno. Proteínas de control adecuadas o ARN incluyen controles negativos tales como, por ejemplo, tejido normal o líquido biológico de un mamífero libre de tumor o proteína o ARN aislado de tejido normal o fluido biológico recogido de un mamífero libre de tumor. Los controles en el kit también pueden incluir materiales usados para establecer curvas patrón para la cuantificación de la proteína SPARC o ARN o material de tumores sensibles y resistentes. Los kits de la invención también pueden comprender un medio para determinar el estado de Her2 del tumor.

Los kits inventivos comprenderían además reglas para predecir la respuesta del tumor. Tales reglas se basarían en la predicción de la respuesta a un agente quimioterapéutico dado sobre el nivel de la proteína SPARC o ARN detectado como se describe en el presente documento en relación con los procedimientos de predicción o determinación de una respuesta a agente quimioterapéutico. Por ejemplo, un nivel particular de la proteína SPARC o ARN, basándose en la experiencia pasada, puede indicar que un agente quimioterapéutico debe usarse. Está dentro de la habilidad del experto habitual en la materia generar, sin experimentación adicional, datos adecuados (por estudios prospectivos, estudios retrospectivos o una combinación de los mismos) para determinar el nivel de proteína SPARC o ARN predictivo de respuesta a un agente quimioterapéutico dado.

La proteína SPARC es responsable de la acumulación de albúmina en ciertos tumores humanos. Como la albúmina es el principal vehículo de fármacos quimioterapéuticos, el nivel de expresión de SPARC es indicativo de la cantidad de fármaco quimioterapéutico que penetra y es retenido por el tumor. Por tanto, el nivel de expresión de SPARC es predictivo de la sensibilidad del tumor a quimioterapia.

Cualquier muestra biológica adecuada puede aislarse del mamífero de interés en el contexto del procedimiento inventivo. Preferentemente, la muestra biológica se aísla del tumor, tal como por una biopsia de tumor. Alternativamente, la muestra biológica puede aislarse de un fluido corporal del mamífero que incluye, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero u orina. Técnicas y procedimientos para el aislamiento de muestras biológicas son conocidas para aquellos en la materia.

Los tipos de tumor que van a detectarse, cuya respuesta a quimioterapia va a predecirse o determinarse, que pueden tratarse según la invención son generalmente aquellos encontrados en seres humanos y otros mamíferos. Los tumores también pueden ser el resultado de inoculación, tal como en animales de laboratorio. Muchos tipos y formas de tumores se encuentran en afecciones humanas y de otros animales, y no hay intención de limitar la aplicación de los procedimientos de la presente a cualquier tipo de tumor particular o variedad. Los tumores, como es sabido, incluyen una masa anormal de tejido que resulta de la división celular incontrolada y progresiva y también se conoce normalmente como una "neoplasia". Los procedimientos inventivos son útiles para células tumorales y células asociadas del estroma, tumores sólidos y tumores asociados a tejido blando tales como sarcoma de tejido blando, por ejemplo, en un ser humano. El tumor o cáncer puede localizarse en la cavidad bucal o faringe, el aparato digestivo, el aparato respiratorio, huesos y articulaciones (por ejemplo, metástasis óseas), tejido blando, la piel (por ejemplo, melanoma), mama, el aparato genital, el aparato urinario, el ojo y la órbita, el cerebro y el sistema nervioso central (por ejemplo, glioma) o el sistema endocrino (por ejemplo, tiroides) y no se limita necesariamente al tumor primario o cáncer. Tejidos asociados a la cavidad bucal incluyen, pero no se limitan a, la lengua y tejidos de la boca. El cáncer puede producirse en tejidos del aparato digestivo que incluyen, por ejemplo, el esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, vesícula biliar y páncreas. Los cánceres del aparato respiratorio pueden afectar a la laringe, pulmón y bronquio e incluyen, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas. Los

tumores pueden producirse en el cuello uterino, cuerpo uterino, vulva del ovario, vagina, próstata, testículos y pene, que constituyen los aparatos genitales masculinos y femeninos, y la vejiga urinaria, riñón, pelvis renal y uretra, que comprende el aparato urinario. El tumor o cáncer puede localizarse en la cabeza y/o cuello (por ejemplo, cáncer laríngeo y cáncer paratiroideo). El tumor o cáncer también puede localizarse en el sistema hematopoyético o sistema linfático e incluyen, por ejemplo, linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), mieloma múltiple o leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, y similares). Preferentemente, el tumor se localiza en la vejiga, hígado, ovario, riñón, intestino, cerebro o mama.

### 10 III. Realizaciones de elección de diana

La invención también proporciona un procedimiento para administrar un agente quimioterapéutico a un tumor en un ser humano u otro mamífero. El procedimiento comprende administrar a un ser humano u otro mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de administración, tal como una composición farmacéutica, en el que el agente de administración (por ejemplo, la composición farmacéutica) comprende el agente quimioterapéutico acoplado a un polipéptido SPARC. Las composiciones farmacéuticas incluyen preferentemente el agente quimioterapéutico acoplado al grupo de reconocimiento de SPARC y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las descripciones del agente quimioterapéutico, tumor, mamífero y componentes de las mismas expuestas en el presente documento a propósito de otras realizaciones de la invención también son aplicables a aquellos mismos aspectos del procedimiento anteriormente dicho de administrar un agente quimioterapéutico a un tumor.

En otras realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para administrar un agente farmacéuticamente activo a modo de un polipéptido SPARC a un sitio de enfermedad que expresó un resto de unión a SPARC. Tales enfermedades incluyen afecciones anormales de proliferación, remodelación de tejido, hiperplasia y cicatrización exagerada en tejido corporal (por ejemplo, tejido blando, tejido conjuntivo, hueso, órganos sólidos, vaso sanguíneo y similares). Ejemplos de enfermedades que son tratables o pueden diagnosticarse administrando una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico acoplado a un compuesto o ligando que puede unirse a una proteína SPARC, u otra proteína de unión a albúmina, incluyen cáncer, retinopatía diabética u otra, inflamación, artritis, reestenosis en vasos sanguíneos, injertos de vasos sanguíneos artificiales o dispositivos intravasculares, y similares. Descripciones del agente farmacéuticamente activo, tumor, mamífero y componentes de las mismas expuestas en el presente documento a propósito de otras realizaciones de la invención también son aplicables a aquellos mismos aspectos del procedimiento anteriormente dicho de administrar un agente farmacéuticamente activo.

La invención también proporciona un procedimiento para administrar un agente quimioterapéutico a un tumor en un mamífero. El procedimiento comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende el agente quimioterapéutico acoplado a una proteína SPARC que puede unirse a albúmina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Procedimientos para acoplar o la conjugación de agentes terapéuticos, agentes quimioterapéuticos, radionúclidos, polipéptidos adecuados y similares a anticuerpos o fragmentos de los mismos se describen bien en la materia. Por ejemplo, la invención proporciona polipéptido SPARC tal como, por ejemplo, conjugados de SPARC-radionúclido, SPARC-fármaco, SPARC-inmunomodulador o SPARC-toxina. Cualquier procedimiento adecuado puede usarse según la invención para formar los conjugados de SPARC. Por ejemplo, sin limitación, grupos amino libres en proteínas SPARC, tales como el grupo epsilon-amino de lisina, pueden conjugarse con reactivos tales como carbodiimidas o agentes heterobifuncionales. Alternativamente, por ejemplo, grupos sulfhidrilo de SPARC pueden usarse para la conjugación. Además, pueden oxidarse restos de azúcar unidos a glucoproteínas de SPARC para formar grupos aldehído útiles en varios procedimientos de acoplamiento conocidos en la técnica. Los conjugados formados según la invención pueden ser estables *in vivo* o lábiles, tal como enlaces tetrapéptido enzimáticamente degradables o enlaces cis-aconitilo o hidrazona lábiles a ácidos.

Para su uso *in vivo*, el agente quimioterapéutico acoplado a un compuesto o ligando que puede unirse a la proteína SPARC se formula deseablemente en una composición farmacéutica que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable. Cualquier vehículo fisiológicamente adecuado aceptable puede usarse dentro del contexto de la invención, y tales vehículos son muy conocidos en la técnica.

El vehículo normalmente será líquido, pero también puede ser sólido, o una combinación de componentes líquidos y sólidos. El vehículo es deseablemente un vehículo fisiológicamente aceptable (por ejemplo, uno farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable) (por ejemplo, excipiente o diluyente). Vehículos fisiológicamente aceptables son muy conocidos y están fácilmente disponibles. La elección del vehículo se determinará, al menos en parte, por la localización del tejido diana y/o células, y el procedimiento particular usado para administrar la composición.

### IV. Modos de administración de las realizaciones terapéuticas y de elección de diana

Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, tanto como disoluciones como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para uso para preparar disoluciones o

suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que contienen estabilizadores de proteínas conocidos y lioprotectores, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso, y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la formulación debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. Las disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo tal como hidroxixelulosa. También puede prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones de almacenamiento y uso habituales, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

El agente quimioterapéutico (por ejemplo, terapia con SPARC) acoplado a una proteína SPARC puede formularse en una composición en una forma neutral o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o tales como ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

La composición puede comprender adicionalmente cualquier otro componente adecuado, especialmente para potenciar la estabilidad de la composición y/o su uso final. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición de la invención. Las siguientes formulaciones y procedimientos son simplemente a modo de ejemplo y no son de ninguna forma limitantes.

Formulaciones adecuadas para administración por inhalación incluyen formulaciones de aerosol. Las formulaciones de aerosol pueden disponerse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También pueden formularse como preparaciones no presurizadas para la administración de un nebulizador o un atomizador.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizadores y conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en dosis unitaria o recipientes cerrados de múltiples dosis tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que sólo requiere la adición de un excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de uso. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

Formulaciones adecuadas para administración anal pueden prepararse como supositorios mezclando el principio activo con una variedad de bases tales como bases de emulsionante o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o fórmulas de espray que contienen, además del principio activo, tales vehículos como se sabe en la técnica que son apropiados.

Además, la composición puede comprender agentes terapéuticos o biológicamente activos adicionales. Por ejemplo, pueden estar presentes factores terapéuticos útiles en el tratamiento de una indicación particular. Factores que controlan la inflamación, tal como ibuprofeno o esteroides, pueden ser parte de la composición para reducir la hinchazón e inflamación asociada a la administración *in vivo* de la composición farmacéutica y molestia fisiológica.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, que no debe interpretarse de ningún modo como limitantes de su alcance.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la unión específica del anticuerpo anti-SPARC a SPARC.

Se preparó extracto de células completas a partir de células HUVEC por sonicación. La proteína se separó en una SDS-PAGE al 5-15%, se transfirió sobre una membrana de PVDF y se visualizó con un anticuerpo policlonal contra SPARC y un anticuerpo monoclonal contra SPARC. Ambos anticuerpos reaccionaron dando una única banda a 38 kDa, el peso molecular correcto para SPARC. Cuando la línea celular tumoral MX-1 se analizó por el mismo procedimiento, SPARC se detectó en tanto el lisado celular clarificado como la fracción de membrana rica en membrana.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la ausencia de expresión de SPARC en tejidos normales.

- 5 Se inmunotñieron tejido humano y de ratón normal y se puntuaron (0-4) para tinción de SPARC usando una matriz de tejido tumoral y normal. La inmunotinción se realizó usando anticuerpo anti-SPARC de conejo policlonal. La SPARC no se expresó en ninguno de los tejidos normales, con la excepción del esófago. Asimismo, SPARC no se expresó en ninguno de los tejidos de ratón normales, excepto el riñón del ratón hembra. Sin embargo, es posible que esta expresión fuera debida a la folistatina, que es idéntica a SPARC.

10

Tabla 1. Expresión de SPARC en tejidos normales humanos

Estómago	0/8
Colon	0/9
Recto	0/15
Hígado	0/14
Bazo	0/10
Pulmón	0/14
Riñón	1/14
Cerebro	1/14
Testículos	0/8
Próstata	0/3
Corazón	0/9
Amígdala	0/10
Ganglios linfáticos	0/10
Apéndice	0/10
Esófago	5/5
Páncreas	0/5
Globo ocular	0/5
Ovario	0/5

Tabla 2. Expresión de SPARC en tejidos normales de ratón

Hígado	0/19
Riñón (M)	0/8
Riñón (F)	6/8
Pulmón	0/16
Músculo	0/20
Cerebro	0/20
Corazón	0/18
Estómago	0/20
Bazo	0/20

15 Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la expresión de SPARC en células tumorales MX-1.

- 20 Se cultivaron células MX-1 sobre un cubreobjetos y se tiñeron con un anticuerpo dirigidos contra SPARC humana usando procedimientos conocidos en la técnica. Se observó tinción del anticuerpo, que demuestra que MX-1 está expresando SPARC. Estos resultados sugieren que la expresión de SPARC detectada en células tumorales MX-1 es un resultado de secreción de SPARC por células tumorales MX-1. La tinción fue más intensa para células tumorales MX-1 que la de células primarias normales tales como HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana), HLMVEC (células endoteliales de microvasos de pulmón humano) y HMEC (células epiteliales mamarias humanas).
- 25 Aunque la mayoría de la tinción de SPARC fue SPARC interna, se detectó un nivel significativo de SPARC de superficie como se demuestra por microscopía confocal y tinción de células impermeabilizadas.

Ejemplo 4

- 30 Este ejemplo demuestra la unión de SPARC a albúmina mediante la unión directa de albúmina marcada fluorescentemente para filtrar SPARC inmovilizada.

- 35 Se inmovilizó SPARC purificada sobre membrana de PVDF y se hizo reaccionar con concentración creciente de albúmina de suero humano/albúmina de suero bovino (HSA/BSA) que había sido marcada con el fluorocromo Alexa 488. La unión se demostró con  $CI_{50}$  a aproximadamente el equivalente de una concentración en plasma de HSA del 5% (peso/volumen) (FIG. 1).

Específicamente se usa el siguiente protocolo:

- 1) Incubar membrana con 30% de metanol durante 5 min usando el sistema de filtración de 96 pocillos estéril MultiScreen (HTS) de Millipore (nº de cat.: MSIPS4510);
- 2) Lavar dos veces con disolución salina equilibrada de Hank (HSBS);
- 3) Incubar con 100 µl de 5 µg/100 µl de disolución de SPARC purificada en HSBS;
- 4) Después de 1 hora a 25°C, separar por lavado dos veces con HSBS;
- 5) Bloquear con 5% de leche durante la noche (5% de leche en polvo desnatada (Carnation) en 1x TBS) a 4°C;
- 6) Lavar dos veces con HSBS;
- 7) Incubar con albúmina (resuspender 5 mg de BSA-Alexa fluor 488 (Molecular Probes) con 1 ml de inyección de HSA al 25%, BAXTER);
- 8) Después de 1 hora, lavar tres veces con HSBS;
- 9) Leer con un fluorímetro usando longitud de onda de detección para Alexa fluor 488;
- 10) La unión específica es la unión total menos la unión a membrana sin SPARC; y
- 11) Representar la unión específica frente a la concentración de HSA (%).

Los resultados también demuestran que SPARC acumulada en un tumor podrían servir de pozo para HSA.

## 20 Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la co-localización de SPARC con albúmina en un xenoinjerto de tumor MX-1.

Se ha mostrado que nanopartículas de paclitaxel-albúmina (Abraxane, ABX o ABI-007) tienen una tasa de respuesta mejorada con respecto a Taxol (TAX) en un ensayo de cáncer de mama metastásico de fase 3 (33% frente al 19%,  $p < 0,0001$ ) (véase, por ejemplo, O'Shaughnessy, SABCS). Recientemente se demostró el transporte transendotelial de paclitaxel (P) mediado por albúmina y el aumento de la acumulación intratumoral de paclitaxel para ABX frente a TAX (véase, por ejemplo, Desai, SABCS 2003). La albúmina se une a SPARC (véase, por ejemplo, Schnitzer, J. Biol. Chem., 269, 6072-82 (1994)).

La línea celular tumoral MX-1 se deriva de un cáncer de mama humano. Criosecciones en serie de xenoinjerto de tumor MX-1 humano, tejidos tumorales de mama primarios humanos ( $n=141$ ) y tejido de mama humana normal ( $n=115$ ) se inmunotifieron y se puntuaron (0-4) para tinción de albúmina, SPARC (usando anticuerpo anti-SPARC) y caveolina-1. Las células MX-1 cultivadas también se inmunotifieron para SPARC. Las nanopartículas de paclitaxel-albúmina (Abraxane, ABX o ABI-007) y taxol (TAX) se prepararon con paclitaxel (P) radiactivo (20 mg/kg IV) y se usaron para determinar la biodistribución de paclitaxel en tejidos normales de ratones atímicos.

La tinción de albúmina en el tumor MX-1 fue focal y se co-localizó con SPARC (La FIG. 2). La tinción con caveolina-1 confirmó que la densidad de vasos sanguíneos en áreas que contenían albúmina no era diferente de áreas sin albúmina. La expresión de SPARC por células cultivadas MX-1 se confirmó por tinción positiva con anticuerpo anti-SPARC. La acumulación de paclitaxel en tejidos normales (negativo para SPARC) fue significativamente inferior para ABX con respecto a TAX ( $p < 0,004$ ) para 7/10 tejidos. El 46% de los tumores de mama primarios humanos presentaron una fuerte tinción de SPARC (puntuación  $> 2$ ) con respecto al 1% para tejidos normales ( $p < 0,0001$ ). En un subconjunto de 50 tejidos tumorales, la expresión de SPARC no estableció una correlación con la estadificación, estado de ER o estado de PgR; sin embargo, hubo una tendencia a una alta expresión de SPARC entre tumores negativos para p53.

La co-localización de albúmina y SPARC sugiere que SPARC, por su actividad de unión a albúmina, puede comportarse como una diana intratumoral para unión a albúmina en tumores de mama. Como el transporte de paclitaxel en ABX depende de la albúmina (véase, por ejemplo, Desai SABCS, 2003), esto puede explicar la acumulación de tumor mejorada de ABX con respecto a TAX. La acumulación de ABX en tejidos normales fue inferior a la de TAX, de acuerdo con la falta de expresión de SPARC en tejidos normales. El cribado de pacientes para SPARC permite la identificación de pacientes más sensibles a ABX. La presencia de SPARC en estos tumores permite elegir diana y terapia usando anticuerpo anti-SPARC.

## 55 Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la transcitosis caveolar mediada por receptor endotelial (gp60) de nanopartículas de paclitaxel-albúmina (ABI-007).

Las nanopartículas de paclitaxel (P)-albúmina (Abraxane, ABX o ABI-007) demostraron tasa de respuesta mejorada con respecto a Taxol en un ensayo de cáncer de mama metastásico de fase III (33% frente al 19%,  $p < 0,0001$ ) (SABCS, O'Shaughnessy y col., 2003). Cremophor en Taxol (TAX) atrapa P en micelas en plasma, reduciendo el paclitaxel disponible para el reparto celular (véase, por ejemplo, Sparreboom y col., Cancer. Res., 59, 1454 (1999)). Estudios en ratones atímicos han mostrado un 30-40% de mayores concentraciones de paclitaxel intratumor con ABX con respecto a dosis iguales de TAX (SABCS, Desai y col., 2003). La albúmina es transportada a través de

células endoteliales (CE) por el transporte caveolar mediado por receptor específico (gp60) (véase, por ejemplo, John y col., *Am. J. Physiol.*, 284, L187 (2001)). Se planteó como hipótesis que el paclitaxel unido a albúmina en ABX puede transportarse a través de CE de microvasos de tumor por gp60, y este mecanismo puede ser particularmente activo para ABX con respecto a TAX.

5 Se realizaron una serie de experimentos para evaluar la unión y el transporte de paclitaxel por células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y células endoteliales de microvasos de pulmón humano (HLMVEC) para ABX y TAX. Se usó paclitaxel fluorescente (FP) como sonda y se formularon ABX y TAX fluorescentes con FP para sondear la unión y transportar paclitaxel a través de monocapas de CE cultivadas sobre un aparato Transwell.

10 La unión de paclitaxel a células (HUVEC) fue 10X mayor para ABX que para TAX. El transporte de paclitaxel de ABX a través de monocapas de CE se potenció 2-3 veces y 2-4 veces para HUVEC y HLMVEC, respectivamente, con respecto a TAX. El transporte dependió de la albúmina. El transporte de paclitaxel de ABX se inhibió por la presencia de anticuerpo anti-SPARC, que se sabe que se une a gp60, el receptor requerido para la transcitosis de albúmina caveolar. Inhibidores conocidos de transcitosis caveolar, NEM y beta-metilciclodextrina (BMC), también inhibieron el transporte de paclitaxel de ABX a través de las monocapas endoteliales (FIG. 3). La inhibición del transporte caveolar disminuyó el transporte de P de ABX al nivel del transporte de TAX.

15 Estos resultados demuestran que paclitaxel de ABX es activamente transportado a través de CE por transcitosis caveolar mediada por gp60, mientras que P de TAX parece transportarse a una tasa de 2-4 veces inferior, principalmente por un mecanismo paracelular (no caveolar). Esta ruta puede ser en parte responsable del aumento de concentraciones intratumorales de paclitaxel observadas en ABX con respecto a TAX. Cremophor en TAX inhibe la transcitosis de paclitaxel a través de células endoteliales.

#### 25 Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la internalización de albúmina marcada en células tumorales MX-1 y la colocalización dentro de la célula MX-1 con expresión intracelular de SPARC.

30 Se cultivaron células MX-1 sobre un cubreobjetos y se permeabilizaron con agentes adecuados. Las células se expusieron a albúmina fluorescente y tras el lavado se expusieron a anticuerpo para SPARC. Esto fue seguido de exposición a un anticuerpo secundario que tenía una marca fluorescente diferente a la de la albúmina. Se observó sorprendentemente que la albúmina marcada se colocalizó con la presencia de SPARC dentro de la célula que indica que la albúmina se internalizó rápidamente y eligió como diana SPARC intracelular.

#### 35 Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra un aumento en la transcitosis endotelial por gp60 (receptor de albúmina) de composiciones farmacéuticas que comprenden paclitaxel y albúmina con respecto a Taxol.

40 Se cultivaron células endoteliales de microvasos de pulmón humano (HLMVEC) a confluencia en un Transwell. La composición farmacéutica inventiva que comprendía paclitaxel y albúmina, o Taxol que contenía paclitaxel fluorescente (Flutax) a una concentración de 20 µg/ml, se añadió a la cámara superior de Transwell.

45 El transporte de paclitaxel por transcitosis de la cámara superior a la cámara inferior se monitorizó continuamente usando un fluorímetro. También se usó un control que sólo contenía Flutax sin albúmina. El control con Flutax no mostró transporte, validando la integridad de la monocapa de HLMVEC confluyente. El transporte de paclitaxel de la composición de albúmina-paclitaxel fue mucho más rápido que el de paclitaxel de Taxol en presencia de 5% de HSA (concentración fisiológica). Las constantes de velocidad de transporte ( $K_t$ ) para la composición de albúmina-paclitaxel y Taxol fueron  $1,396 \text{ h}^{-1}$  y  $0,03 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. La cantidad total de paclitaxel transportado a través de la monocapa fue tres veces superior para la composición de albúmina-paclitaxel que el Taxol. Por tanto, el uso de albúmina u otro mimético adecuado que incluye anticuerpos o fragmentos contra el receptor gp60 u otro receptor de células endoteliales puede ayudar en el transporte de un agente terapéutico deseado a través de la barrera endotelial en el intersticio tumoral.

#### 55 Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra la expresión en exceso de la proteína SPARC en células de carcinoma de mama humano.

60 La expresión de SPARC en células de carcinoma de mama humano se determinó usando una matriz de tumor de Cybrdi, Inc. (Gaithersburg, MD). Los resultados de este análisis se exponen en Tabla 1. La intensidad de tinción se puntuó de "Negativa" a 4+, correspondiéndose el mayor número con la mayor intensidad de expresión en exceso. El 49% de carcinoma de mama se tiñó positivo (2+ y por encima) para SPARC con respecto al 1% de tejido normal ( $p < 0,0001$ ).

65

Tabla 3. Expresión de SPARC en cáncer de mama

	Tinción de SPARC (%)					
	Negativa	-/+	1+	2+	3+	4+
Células de carcinoma	31 (34%)	14 (15%)	1 (1%)	11 (12%)	9 (10%)	25 (27%)
Células normales	93 (89%)	7 (7%)	4 (4%)	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)

## Ejemplo 10

- 5 Este ejemplo demuestra la expresión de SPARC en exceso en cánceres de cabeza y cuello de células escamosas con altas tasas de respuesta usando nanopartícula de paclitaxel unido a albúmina (ABI-007).

En estudios clínicos de fase I y II de pacientes con carcinoma de células escamosas (SCC) de cabeza y cuello (C&C) y canal anal se observaron tasas de respuesta del 78% y el 64%, respectivamente, para nanopartícula de paclitaxel unido a albúmina administrada intra-arterialmente (Abraxane®, ABX o ABI-007) (véase, por ejemplo, Damascelli y col., Cancer, 92(10), 2592-2602 (2001) y Damascelli y col., AJR, 181, 253-260 (2003)). En la comparación de la citotoxicidad *in vitro* de ABX y Taxol (TAX) los inventores observaron que una línea de cuello uterino escamoso (A431) demostró  $CI_{50}$  mejoradas para ABX (0,004  $\mu\text{g/ml}$ ) frente a TAX (0,012  $\mu\text{g/ml}$ ). Recientemente se demostró el transporte caveolar transendotelial de paclitaxel (P) mediado por albúmina y el aumento de la acumulación intratumoral de P para ABX frente a TAX (véase, por ejemplo, Desai, SABCS 2003).

Se inmunotizaron tejidos de tumor de C&C humanos (n=119) y tejido de C&C humano normal (n=15) y se puntuaron (0-4+) para la tinción de SPARC usando una matriz de tejido tumoral y normal. La inmunotinción se realizó usando anticuerpo anti-SPARC de conejo policlonal. En un nuevo estudio de aumento de dosis de fase I (ABX administrado IV durante 30 minutos 1 vez cada 3 semanas), un subconjunto de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (n=3) se analizaron para la respuesta a ABX.

SPARC se expresó en exceso (puntuación > 2+) en el 60% (72/119) de los tumores de C&C frente al 0% (0/15) en tejidos normales ( $p < 0,0001$ ). En el estudio de fase I, 2/3 pacientes con C&C alcanzaron la respuesta parcial (RP) después de 2 ciclos de tratamiento a niveles de dosis de 135  $\text{mg/m}^2$  (1 paciente) y 225  $\text{mg/m}^2$  (1 paciente). Un tercer paciente progresó a 260  $\text{mg/m}^2$ .

Se encontró que SPARC se expresaba en exceso en el 60% de los tumores de C&C de células escamosas. Esto puede explicar la alta actividad de un único agente de ABX previamente observada en cánceres de C&C de células escamosas debido a la unión de paclitaxel unido a albúmina a SPARC expresada en estos tumores. 2/3 pacientes con tumores de C&C de células escamosas alcanzaron RP en un nuevo estudio de fase I. Los tejidos de tumor de C&C humanos (n=119) y tejido de C&C humano normal (n=15) se inmunotizaron y se puntuaron (0-4+) para tinción de SPARC usando una matriz de tejido tumoral y normal. La inmunotinción se realizó usando anticuerpo anti-SPARC de conejo policlonal. SPARC se expresó en exceso (puntuación > 2+) en el 60% (72/119) de los tumores de C&C frente al 0% (0/15) en tejidos normales ( $p < 0,0001$ ). Esto puede explicar la alta actividad de un único agente de ABX previamente observada en cánceres de C&C escamosos debido a la unión de paclitaxel unido a albúmina a SPARC expresada en estos tumores.

En un nuevo estudio de aumento de dosis de fase I (ABX administrado IV durante 30 minutos 1 vez cada 3 semanas), un subconjunto de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (n=3) se analizó para la respuesta a ABX. En el estudio de fase I, 2/3 pacientes con C&C alcanzaron respuesta parcial (RP) después de 2 ciclos de tratamiento a niveles de dosis de 135  $\text{mg/m}^2$  (1 paciente) y 225  $\text{mg/m}^2$  (1 paciente). Un tercer paciente progresó a 260  $\text{mg/m}^2$ . Los tejidos tumorales de estos pacientes se tiñeron para SPARC y 1 de los pacientes que respondió mostró una fuerte expresión en exceso para SPARC.

## Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra la correlación de la expresión en exceso de SPARC con altas tasas de respuesta usando nanopartícula de paclitaxel unida a albúmina (ABI-007) en cánceres de cabeza y cuello escamosos.

En otro estudio clínico de fase II de 54 pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello tratados con ABX intra-arterial se observó una tasa de respuesta global del 78%. Las biopsias de cáncer de 16 pacientes en este estudio que recibieron ABX intra-arterial se evaluaron para la expresión de SPARC y correlación con respuesta clínica. La tinción con anticuerpo anti-SPARC policlonal (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) se puntuó en una escala de 0-4 (0= sin tinción, 4+= positiva fuerte). La expresión positiva de SPARC se identificó como tinción > 2+ y la expresión negativa de SPARC se identificó como tinción < 2+. Los pacientes que respondieron a ABX presentaron mayor incidencia de expresión de SPARC (10/11, 91%) frente a los pacientes que no respondieron (2/5, 40%) ( $p = 0,06$ ). La respuesta a ABX fue significativamente mayor para pacientes positivos para SPARC (10/12 = 83%) frente a pacientes negativos para SPARC (1/4 = 25%) ( $p = 0,06$ ). Además, los pacientes negativos para SPARC presentaron tasa de respuesta significativamente inferior a la tasa de respuesta global en el estudio (incluyendo pacientes tratados con ABX u otros agentes quimioterapéuticos) (1/4, 25% frente a 42/54, 78%;  $p < 0,05$ ).

## Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra que células tumorales que expresan SPARC son más sensibles a Abraxane<sup>®</sup> que células tumorales que no expresan SPARC.

5 Un vector de expresión con promotor del CMV accionando la expresión de SPARC se transfectó en células PC3. Los integrantes estables con alta expresión de SPARC se seleccionaron por G418 (a 500 µg/ml de medio de cultivo). Uno de estos clones, HN104, presentó alta expresión de SPARC por RT-PCR y por transferencia Western. Este clon se cultivó en ratones sin pelo atímicos como xenoinjerto. El crecimiento y la respuesta de HN104 a Abraxane<sup>®</sup> (‘‘ABX’’ en FIGS. 4) se compararon con el crecimiento y la respuesta de la línea celular parental PC3 a Abraxane<sup>®</sup>. Abraxane<sup>®</sup> se dosificó cuando el tumor alcanzó 100 mm<sup>3</sup> a nivel de dosis de 15 mg/kg por día durante cinco días.

15 HN104 presentó una fase de latencia prolongada frente a la del xenoinjerto PC3 parental. El crecimiento fue similar tras completarse la fase de latencia, ya que las curvas de tumor de PC3 y HN104 fueron similares cuando HN104 se desplazó a la izquierda 2 semanas (FIG. 4). Como se muestra en la FIG. 4 (la FIG. 4 representa el volumen tumoral ajustado para las fases de latencia inducidas por SPARC en las células transfectadas desplazando las curvas de HN104 20 días a la izquierda), la línea celular que expresaba en exceso SPARC presentó sensibilidad significativamente mayor por Abraxane<sup>®</sup> que la línea celular parental. Para volúmenes tumorales de 100-800 mm<sup>3</sup>, los volúmenes de tumor de tamaño equivalente que separan días promedio en el tratado frente a sin tratar fue 25 días para PC3 y 36 días para HN104. Por tanto, SPARC sensibiliza células de cáncer de próstata a Abraxane<sup>®</sup>.

## Ejemplo 13

25 Para explorar adicionalmente la actividad sensibilizante a quimioterapia de SPARC se usó el sistema de xenoinjerto de tumor de ratón atímico para evaluar la sensibilización de células de cáncer colorrectal humano HT 29 a 5-fluorouracilo (‘‘5-FU’’).

30 Las células cancerosas se implantaron subcutáneamente bilateralmente en ratones atímicos. Los ratones se trataron con solución salina o 25 mg/kg de 5-FU (véase la Tabla 4). Aquellos animales que recibieron SPARC se trataron con polipéptido natural (SEC ID N<sup>o</sup>:1) a una dosis de 4 mg/kg, 6 mg/kg o 8 mg/kg (véase la tabla 4). Los animales se monitorizaron para supervivencia y crecimiento de xenoinjerto como medidas de eficacia y cambio en el peso corporal como medida de toxicidad. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4  
Actividad antitumoral de 5-FU solo y en combinación con BIO1 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon HT29 humano s.c. en ratones sin pelo

Agente	Dosis (mg/kg) <sup>a</sup>	ICT (%) <sup>b,c</sup>	% de PPC máx
Solución salina	0	-	-1,3
5-FU	25	79,8	-5,8
5-FU + BIO1 (200 µg)	25 + 8	10,4	-3,3
5-FU + BIO1 (150 µg)	25 + 6	47,4	-7,4
5-FU + BIO1 (100 µg)	25 + 4	50,8	-6,5

<sup>a</sup>5-FU, IP: Cada 2 díasx3/2 semanas (2 ciclos); BIO1, IP; Cada 3 díasx2/6 semanas

<sup>b</sup>TGI, inhibición del crecimiento tumoral

<sup>c</sup>Después del día de tratamiento 25

35 La FIG. 5 muestra las curvas del volumen tumoral para el grupo de animales tratado con SPARC natural (‘‘BIO1’’ ) y sus controles. SPARC natural fracasó en sensibilizar las células cancerosas a 5-FU a cualquiera de las concentraciones de SPARC usadas.

40 Este ejemplo demuestra que SPARC no es un sensibilizador universal y que su actividad sensibilizante puede depender de la biología de las células cancerosas y/o la terapia administrada.

## Ejemplo 14

45 Se usó un ensayo de angiogénesis *in vitro* (TSC CellWorks Angiokit) para evaluar la actividad angiogénica de SPARC, que sorprendentemente mostró que la actividad angiogénica de SPARC era dependiente de la concentración.

50 En este sistema, células endoteliales de la vena umbilical humana (‘‘HUVEC’’ ) se co-cultivan con otras células humanas (fibroblasto) en matriz de colágeno. Las células HUVEC forman inicialmente pequeños islotes dentro de la matriz de cultivo. HUVEC se diferencian, proliferan y entran en la fase migratoria durante la cual se mueven por la matriz y forman estructuras de túbulos similares a hilos (9-11 días). Éstos se unen gradualmente y forman una red que se parece al lecho capilar.

Células HUVEC cultivadas en una matriz tridimensional se trataron con diversa concentración del polipéptido SPARC natural (SEC ID N°: 1) o el polipéptido SPARC mutante Q3 (SEC ID N°: 3). Los microtúbulos capilares se visualizaron usando inmunotinción para CD31 después de 12 días en cultivo. La FIG. 6 representa el efecto dependiente de la concentración de SPARC sobre la neoangiogénesis que muestra ejemplos característicos de la densidad microtubular capilar en ausencia de SPARC (0 µg/ml), SPARC natural o Q3 a 10 µg/ml, y SPARC natural o Q3 a 100 µg/ml.

Sorprendentemente, SPARC a 10 µg/ml es proangiogénica, mientras que SPARC a 100 µg/ml inhibe la angiogénesis.

Ejemplo 15

Este ejemplo demuestra un efecto sinérgico de combinar SPARC, un inhibidor de la angiogénesis putativo y Abraxane® en un modelo de xenoinjerto de tumor.

En vista del sorprendente hallazgo presentado en el Ejemplo 14 de que la actividad angiogénica de SPARC es dependiente de la concentración, los solicitantes postularon que a menor concentración las actividades anticancerígenas de SPARC pueden enmascararse por su fuerte actividad proangiogénica. Para probar esto se estudió el efecto de añadir un inhibidor de la angiogénesis a una pauta de SPARC más Abraxane®.

Se cultivaron células de cáncer de mama (FIGS. 7 y 8) y de cáncer de colon humano (FIGS. 9 y 10) en ratones sin pelo atímicos como xenoinjertos como en los Ejemplos 12 y 13. Hubo 5 ratones en cada grupo de tratamiento. Los tumores se trataron cuando alcanzaron 200 mm<sup>3</sup>. Los ratones se trataron con cualquiera de: solución salina, como control negativo; SPARC (150 µg/kg 2x/semana), sola; el inhibidor de la angiogénesis Avastin (4 mg/kg dos veces por semana), solo; Abraxane® (15 mg/kg cada cuatro días durante tres tratamientos), solo; SPARC y Abraxane® o SPARC, Avastin y Abraxane®. Se evaluaron tanto SPARC natural ("BIO1") como mutante Q3 ("BIO2"). Los animales se monitorizaron para la supervivencia y el crecimiento de xenoinjertos como medida de la eficacia y el cambio en el peso corporal como medida de la toxicidad. Los resultados se resumen en la siguiente tabla que muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral más allá del producido por Abraxane® solo:

Tabla 5. Inhibición del crecimiento tumoral (ICT) con respecto a Abraxane solo

	Avastin	BIO1 + Abraxane	BIO2 + Abraxane	BIO1 + Abraxane + Avastin	BIO2 + Abraxane + Avastin
Cáncer de mama (MDA-MB-231)	16%	82%	69%	92%	86%
Cáncer de colon (HT29)	<0%	39%	9%	76%	33%

Para SPARC natural y células de cáncer de mama, la terapia con un único agente no fue mejor que los tratamientos de control de solución salina. Como muestra la FIG. 8, la adición de SPARC o de SPARC y Avastin produjo una disminución sustancial en el crecimiento tumoral con respecto a los otros brazos del estudio. La FIG. 9 muestra que la SPARC mutante Q3 dio resultados similares, aunque suavizados.

Para SPARC natural y células de cáncer de colon, la terapia con un único agente con SPARC o Avastin no fue mejor que los tratamientos de control de solución salina. El tratamiento con un único agente con Abraxane® produjo una mejora significativa en el crecimiento tumoral con respecto al control. Como también muestra la FIG. 10, la adición de SPARC o de SPARC y Avastin produjo una disminución adicional en el crecimiento tumoral con respecto a Abraxane® solo. Sin embargo, la FIG. 10 muestra que la SPARC mutante Q3 fracasa en ralentizar el crecimiento tumoral más allá del logrado con Abraxane®, y la adición de Avastin y SPARC Q3 sólo produce una leve mejora en controlar el crecimiento tumoral. Basándose en los cambios en el peso corporal, ninguna pauta fue significativamente más tóxica que cualquier otra pauta.

En otro sistema, Sutent, otro inhibidor de la angiogénesis produjo los mismos resultados. De nuevo, 5 ratones atímicos se inyectaron cada uno subcutáneamente con células de cáncer de mama humano. El tratamiento empezó cuando los tumores crecieron a 100 mm<sup>3</sup>. La terapia consistió tanto en Sutent como en Sutent con SPARC natural ("BIO1"), los resultados se muestran en la Tabla 5 (que muestran el porcentaje de supresión del crecimiento tumoral por debajo del producido por Abraxane® solo) y la FIG. 11.

Tabla 6. Inhibición del crecimiento tumoral (ICT) con respecto a Abraxane solo

	Abraxane +Sutent	Abraxane +Sutent +BIO1
MDA-MB-231	0%	76%

Al igual que con Avastin, el uso de Sutent como una combinación de inhibidor de la angiogénesis, SPARC y Abraxane<sup>®</sup> parece tener un efecto sinérgico.

5 El uso de los términos “un” y “una” y “el” y “la” y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero no se limitan a”,) a menos que se indique lo contrario. La recitación de intervalos de valores en el presente documento está simplemente prevista para servir de un procedimiento de abreviatura de referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto.

15 Listado de secuencias

20 <110> ABRAXIS BIOSCIENCE, INC.  
Trieu, Vuong  
Desai, Neil P.

<120> SPARC Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LA MISMA

25 <130> 702783

<140>PCTUS0860213  
<141> 14-04-2008

30 <150> US 60/923.340  
<151> 13-04-2007

<160> 4

35 <170> Patent In versión 3.4

<210>1  
<211> 286  
<212>PRT  
<213> Homo sapiens  
40 <400> 1

ES 2 389 828 T3

Ala Pro Gln Gln Glu Ala Leu Pro Asp Glu Thr Glu Val Val Glu Glu  
 1 5 10 15

Thr Val Ala Glu Val Thr Glu Val Ser Val Gly Ala Asn Pro Val Gln  
 20 25 30

Val Glu Val Gly Glu Phe Asp Asp Gly Ala Glu Glu Thr Glu Glu Glu  
 35 40 45

Val Val Ala Glu Asn Pro Cys Gln Asn His His Cys Lys His Gly Lys  
 50 55 60

Val Cys Glu Leu Asp Glu Asn Asn Thr Pro Met Cys Val Cys Gln Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Ser Cys Pro Ala Pro Ile Gly Glu Phe Glu Lys Val Cys Ser  
 85 90 95

Asn Asp Asn Lys Thr Phe Asp Ser Ser Cys His Phe Phe Ala Thr Lys  
 100 105 110

Cys Thr Leu Glu Gly Thr Lys Lys Gly His Lys Leu His Leu Asp Tyr  
 115 120 125

ES 2 389 828 T3

Ile Gly Pro Cys Lys Tyr Ile Pro Pro Cys Leu Asp Ser Glu Leu Thr  
 130 135 140

Glu Phe Pro Leu Arg Met Arg Asp Trp Leu Lys Asn Val Leu Val Thr  
 145 150 155 160

Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Asp Asn Asn Leu Leu Thr Glu Lys Gln Lys  
 165 170 175

Leu Arg Val Lys Lys Ile His Glu Asn Glu Lys Arg Leu Glu Ala Gly  
 180 185 190

Asp His Pro Val Glu Leu Leu Ala Arg Asp Phe Glu Lys Asn Tyr Asn  
 195 200 205

Met Tyr Ile Phe Pro Val His Trp Gln Phe Gly Gln Leu Asp Gln His  
 210 215 220

Pro Ile Asp Gly Tyr Leu Ser His Thr Glu Leu Ala Pro Leu Arg Ala  
 225 230 235 240

Pro Leu Ile Pro Met Glu His Cys Thr Thr Arg Phe Phe Glu Thr Cys  
 245 250 255

Asp Leu Asp Asn Asp Lys Tyr Ile Ala Leu Asp Glu Trp Ala Gly Cys  
 260 265 270

Phe Gly Ile Lys Gln Lys Asp Ile Asp Lys Asp Leu Val Ile  
 275 280 285

<210>2  
 <211> 3178  
 <212>ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

5

gttgctgtc tctaaacccc tccacattcc cgcggctcctt cagactgccc ggagagcgcg 60

ctctgctgc cgcctgctg cctgccactg agggttccca gcaccatgag ggcctggatc 120

ttctttctcc ttgctggc cgggagggcc ttggcagccc ctcaagcaaga agccctgctt 180

gatgagacag aggtggtgga agaaactgtg gcagaggtga ctgaggtatc tgtgggagct 240

aatcctgtcc aggtggaagt aggagaattt gatgatggtg cagaggaaac cgaagaggag 300

10

ES 2 389 828 T3

gtggtggcgg aaaatccctg ccagaaccac cactgcaaac acggcaaggt gtgcgagctg 360  
 gatgagaaca acacccccat gtgcgtgtgc caggacccca ccagctgccc agccccatt 420  
 ggcgagtttg agaaggtgtg cagcaatgac aacaagacct tcgactcttc ctgccacttc 480  
 tttgccacaa agtgcaccct ggagggcacc aagaagggcc acaagctcca cctggactac 540  
 atcgggcectt gcaaatacat cccccctgc ctggactctg agctgaccca attccccctg 600  
 cgcctgcggg actggctcaa gaacgtcctg gtcaccctgt atgagaggga tgaggacaac 660  
 aaccttctga ctgagaagca gaagctgcgg gtgaagaaga tccatgagaa tgagaagcgc 720  
 ctggaggcag gagaccaccc cgtggagctg ctggcccggg acttcgagaa gaactataac 780  
 atgtacatct tccctgtaca ctggcagttc ggccagctgg accagcacc cattgacggg 840  
 tacctctccc acaccgagct ggctccactg cgtgctcccc tcatccccat ggagcattgc 900  
 accaccgct ttttcgagac ctgtgacctg gacaatgaca agtacatgc cctggatgag 960  
 tgggccggct gcttcggcat caagcagaag gatatcgaca aggatcttgt gatctaaatc 1020  
 cactccttc acagtaccgg attctctctt taacctccc cttcgtgttt cccccaatgt 1080  
 ttaaaatggt tggatggtt gttgtctgc ctggagacaa ggtgctaaca tagatttaag 1140  
 tgaatacatt aacgggtgcta aaaatgaaaa ttctaacca agacatgaca ttcttagctg 1200  
 taacttaact attaaggcct ttccacacg cattaatagt cccatttttc tcttgccatt 1260  
 tgtagctttg cccattgtct tattggcaca tgggtggaca cggatctgct gggctctgcc 1320  
 ttaaacacac attgcagctt caactttctt cttagtgct ctgcttgaaa ctaatactca 1380  
 ccgagtcaga ctttgtgttc atttcatttc agggcttctg ctgcccgtgg gcttccccag 1440  
 gtggcctgga ggtgggcaa ggaagtaac agacacacga tgttgtcaag gatggttttg 1500  
 ggactagagg ctcagtggtg ggagagatcc ctgcagaacc caccaaccag aacgtggttt 1560  
 gectgaggct gtaactgaga gaaagattct ggggctgtgt tatgaaaata tagacattct 1620  
 cacataagcc cagttcatca ccatttctc cttaccttt cagtgcagtt tcttttca 1680  
 ttaggctgtt ggttcaaaact ttggggagca cggactgtca gttctctggg aagtggtcag 1740  
 cgcctcctgc agggcttctc ctctctgtc ttttgagaaa ccagggtctt tctcaggggc 1800  
 tctagggact gccaggctgt ttcagccagg aaggccaaaa tcaagagtga gatgtagaaa 1860  
 gttgtaaaat agaaaaagtg gagttggtga atcggttgtt ctttctctac atttggatga 1920  
 ttgtcAtaag gtttttagca tgttctctct ttcttctcacc ctcccccttt tcttctatt 1980

ES 2 389 828 T3

aatcaagaga aacttcaaag ttaatgggat ggtcggatct cacaggctga gaactcgttc 2040  
 acctccaage atttcatgaa aaagctgott cttattaate atacaaactc tcaccatgat 2100  
 gtgaagagtt tcacaaatec ttcaaaataa aaagtaatga etttagaaact gccttctctgg 2160  
 gtgatttgca tgtgtcttag tcttagtcac cttattatcc tgacacaaaa acacatgagc 2220  
 atacatgtct acacatgact acacaaatgc aaacctttgc aaacacatta tgcttttgca 2280  
 cacacacacc tgtacacaca caccggcatg tttatacaca gggagtgtat ggttcctgta 2340  
 agcactaagt tagctgtttt catttaatga ectgtggttt aaccttttg atcactacca 2400  
 ccattatcag caccagactg agcagctata tccttttatt aatcatggtc attcattcat 2460  
 tcattcattc acaaaatatt tatgatgtat tfactctgca ccaggcccc aGCCAAGCAC 2520  
 tqgggacaca gttatggcaa agtagacaaa gcatttgctc atttgagct tagagtccag 2580  
 gaggaataca ttagataatg acacaatcaa atataaattg caagatgtca caggtgtgat 2640  
 gaaggagag taggagagac catgagtatg tgtaacagga ggacacagca ttattctagt 2700  
 gctgtactgt tccgtacggc agccactacc cacatgtaac tttttaagat ttaaatttaa 2760  
 attagttaac attcaaaaag cagctcccca atcacactag caacattca agtgcttgag 2820  
 agccatgcat gattagtggc taccctattg aataggctcag aagtagaatc ttttcatcat 2880  
 cacagaaagt tctattggac agtgcctctc tagatcatca taagactaca gagcactttt 2940  
 caaagctcat gcatgttcat catgttagtg tcgtattttg agctgggggt ttgagactcc 3000  
 ccttagagat agagaaacag acccaagaaa tgtgctcaat tgcaatgggc cacataccta 3060  
 gatctccaga tgtcatttcc cctctcttat ttttaagttat gtttaagatta ctaaaacaat 3120  
 aaaagctcct aaaaaatcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3178

<210>3  
 <211>285  
 <212>PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3



ES 2 389 828 T3

	35							40							45
Val	Ala	Glu	Asn	Pro	Cys	Gln	Asn	His	His	Cys	Lys	His	Gly	Lys	Val
	50						55								60
Cys	Glu	Leu	Asp	Glu	Asn	Asn	Thr	Pro	Met	Cys	Val	Cys	Gln	Asp	Pro
65					70					75					80
Thr	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Ile	Gly	Glu	Phe	Glu	Lys	Val	Cys	Ser	Asn
				85					90						95
Asp	Asn	Lys	Thr	Phe	Asp	Ser	Ser	Cys	His	Phe	Phe	Ala	Thr	Lys	Cys
			100					105						110	
Thr	Leu	Glu	Gly	Thr	Lys	Lys	Gly	His	Lys	Leu	His	Leu	Asp	Tyr	Ile
		115					120							125	
Gly	Pro	Cys	Lys	Tyr	Ile	Pro	Pro	Cys	Leu	Asp	Ser	Glu	Leu	Thr	Glu
	130					135						140			
Phe	Pro	Leu	Arg	Met	Arg	Asp	Trp	Leu	Lys	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Leu
145					150					155					160
Tyr	Glu	Arg	Asp	Glu	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Thr	Glu	Lys	Gln	Lys	Leu
				165						170					175
Arg	Val	Lys	Lys	Ile	His	Glu	Asn	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala	Gly	Asp
				180				185						190	
His	Pro	Val	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Asp	Phe	Glu	Lys	Asn	Tyr	Asn	Met
				195				200					205		
Tyr	Ile	Phe	Pro	Val	His	Trp	Gln	Phe	Gly	Gln	Leu	Asp	Gln	His	Pro
	210						215								220
Ile	Asp	Gly	Tyr	Leu	Ser	His	Thr	Glu	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Ala	Pro
225						230					235				240
Leu	Ile	Pro	Met	Glu	His	Cys	Thr	Thr	Arg	Phe	Phe	Glu	Thr	Cys	Asp
				245						250					255
Leu	Asp	Asn	Asp	Lys	Tyr	Ile	Ala	Leu	Asp	Glu	Trp	Ala	Gly	Cys	Phe
				260					265						270

ES 2 389 828 T3

Gly Ile Lys Gln Lys Asp Ile Asp Lys Asp Leu Val Ile  
 275 280 285

5 <210>4  
 <211> 2956  
 <212>ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

```

ctccacatte cegeggtect tcagactgcc cggagagcgc gctctgectg cegeectgect 60
gcctgccact gagggttccc agcaccatga gggcctggat ettctttctc ctttgeectgy 120
ccgggagggc cttggcagcc cctcaagaag ccttgcctga tgagacagag gtggtggaag 180
aaactgtggc agaggtgact gaggtatctg tgggagctaa tcctgtccag gtggaagtag 240
gagaatttga tgatggtgca gaggaaaccg aagaggaggt ggtggcggaa aatccctgcc 300
agaaccacca ctgcaaacac ggcaagggtg gcgagctgga tgagaacaac acccccattgt 360
gcgtgtgcca ggaccccacc agctgccag cccccattgg cgagtttgag aagggtgtgca 420
gcaatgacaa caagaccttc gactotttct gccacttctt tgccacaag tgaccctgg 480
agggcaccaa gaagggccac aagctccacc tggactacat cgggccttgc aaatacatcc 540
ccccttgect ggactctgag ctgaccgaat tccccctgcg catgcgggac tggetcaaga 600
acgtcctggt caccctgtat gagagggatg aggacaacaa ccttctgact gagaagcaga 660
agctgcgggt gaagaagatc catgagaatg agaagcgcct ggaggcagga gaccaccccg 720
tggagctgct ggcccgggac ttcgagaaga actataacat gtacatcttc cctgtacact 780
ggcagttcgy ccagctggac cagcacccea ttgacgggta cctctcccac accgagctgg 840
ctccactgcy tgct.cccctc atccccatgg agcattgcac caccgccttt ttcgagacct 900
gtgacctgga caatgacaag tacatcgccc tggatgagtg ggccggctgc ttcggcatca 960
agcagaagga tatcgacaag gatcttgtga tetaaatcca ctcttccac agtaccggat 1020
tctctcttta accctcccct tcgtgtttcc cccaatgitt aaaatgittg gatggtttgt 1080
tgttctgect ggagacaagg tgctaacata gatttaagtg aatacattaa cgggtctaaa 1140
aatgaaaatt ctaacccaag acatgacatt cttagetgta acttaactat taaggccttt 1200
tccacacgca ttaatagtcc ctttttctc ttgccatttg tagctttgcc cattgtctra 1260
ttggcacatg ggtggacacg gatctgctgg gctctgcctt aaacacacat tgcagcttca 1320
acttttctct ttagtgttct gtttgaaact aatacttacc gagtcagact ttgtgttcat 1380
    
```

10

ES 2 389 828 T3

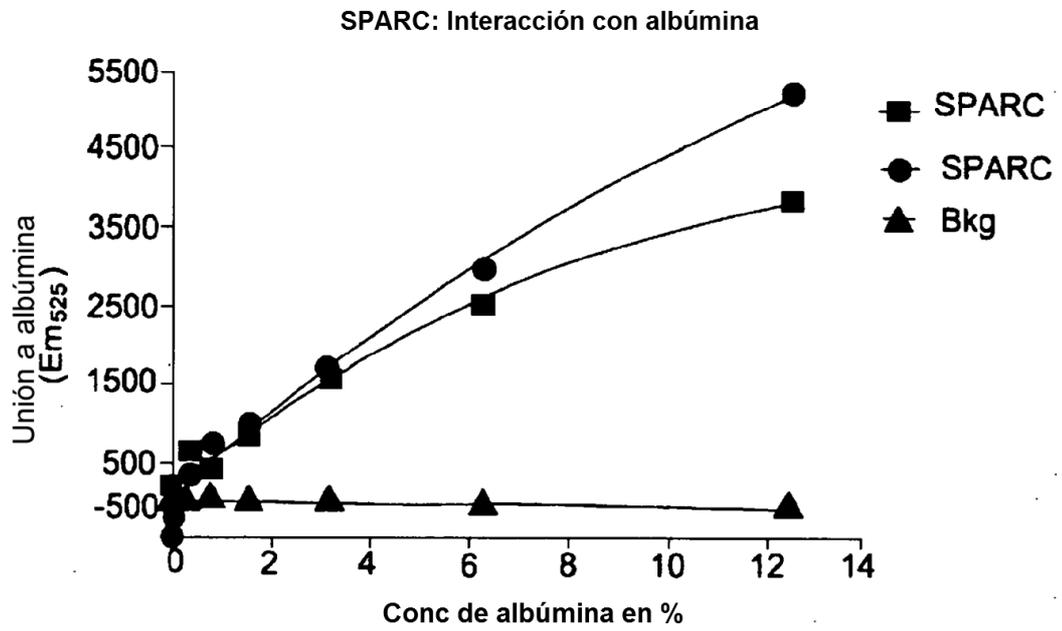
ttcatttcag ggtccttggct gcctgtgggc ttccccaggt ggccctggagg tgggcaaagg 1440  
 gaagtaacag acacacgatg ttgtcaagga tggttttggg actagaggct cagtgggtggg 1500  
 agagatccct gcagaacca ccaaccagaa cgtggtttgc ctgaggctgt aactgagaga 1560  
 aagattctgg ggctgtgta tgaaaatata gacattctca cataagccca gttcatcacc 1620  
 attcctcct ttaccttca gtgcagttc tttcacatt aggctgttg ttcaaacttt 1680  
 tgggagcacg gactgtcagt tctctggaa gtggtcagcg catcctgcag ggcttctcct 1740  
 cctctgtctt ttggagaacc agggctcttc tcaggggctc tagggactgc caggctgttt 1800  
 cagccaggaa ggccaaaatc aagagtgaga tgtagaaagt tgtaaaatag aaaaagtgg 1860  
 gttggtgaat cggttgttct ttctcaccat ttggatgatt gtcataagg ttttagcatg 1920  
 ttctccttt tcttcacct ccccttttt ctctattaa tcaagagaaa ctccaagt 1980  
 aatgggatgg tcggatctca caggctgaga actcgttcc cccaagcat ttcataaaaa 2040  
 agctgcttct tattaatcat acaaaccttc accatgatgt gaagagtct acaaatcctt 2100  
 caaaataaaa agtaatgact tagaaactgc ctctctgggt gatttgcctg tgtcttagtc 2160  
 ttagtacct tattatctg acacaaaaac acatgagcat acatgtctac acatgactac 2220  
 acaaatgcaa acctttgcaa acacattatg cttttgcaca cacacacctg tacacacaca 2280  
 ccggcatgtt tatacacagg gagtgtatgg ttctgtgtaag cactaagtta gctgttttca 2340  
 ttaaatgacc tgtggtttaa cccctttgat cactaccacc attatcagca ccagactgag 2400  
 cagctatct cttttattea tcatggctat tcatctctc attcattcac aaaatattta 2460  
 tgatgtattt actctgcacc aggtcccatg ccaagcactg gggacacagt tatggcaag 2520  
 tagacaaagc atttgttcat ttggagctta gagtccagga ggaatacatt agataatgac 2580  
 acaatcaaat ataaattgca agatgtcaca ggtgtgatga agggagagta ggagagacca 2640  
 tgagtatgtg taacaggag acacagcatt attctagtgc tgtactgttc cgtacggcag 2700  
 ccactacca catgtaactt ttaagattt aaatttaaat tagttaacat tcaaacgca 2760  
 gctccccaat cacactagca acatttcaag tgettggag ccactgcatga ttagtggta 2820  
 cctkattgaa taggtcagaa gtagaatctt ttcatcatca cagaagttc tattggacag 2880  
 tgctcttcta gatcatcata agactacaga gcacttttca aagctcatgc atgttcatca 2940  
 tgttagtgtc gtattt 2956

## REIVINDICACIONES

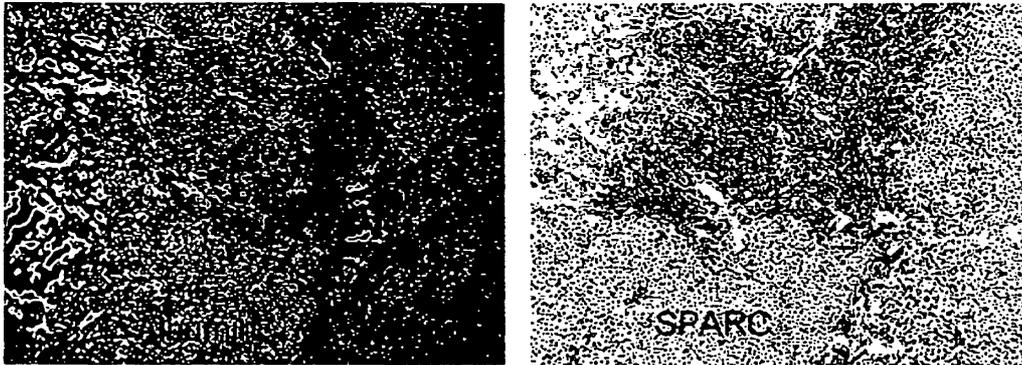
- 5 1. Una composición que comprende un polipéptido SPARC, un inhibidor de la angiogénesis y paclitaxel unido a albúmina para su uso en el tratamiento de un tumor de mamífero.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1, 3 o una combinación de las mismas.
- 10 3. La composición para su uso según la reivindicación 2, en la que el polipéptido SPARC está presente a una concentración de 10 µg/ml a 100 mg/ml.
4. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que más del 50% del paclitaxel unido a albúmina está en forma de nanopartícula.
- 15 5. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el paclitaxel unido a albúmina está presente a una concentración de 10 mg/ml a 100 mg/ml, o a una concentración de 1 mg/ml a 10 mg/ml, o a una concentración de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml.
- 20 6. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la angiogénesis es un inhibidor de mTOR, Aurora cinasa, un inhibidor de VEGFR cinasa, un inhibidor de PDGFR cinasa, sorafenib, Sutent, Axitinib, Avastin, marimastat, bevacizumab, carboxiamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-α, IL-12, factor-4 plaquetario, suramina, SU5416, trombospondina, antagonistas de VEGFR, esteroides angiostáticos, factor inhibidor de la angiogénesis derivado de cartílago, inhibidores de la metaloproteínasa de matriz, angiostatina, endostatina, 2-metoxiestradiol, tecogalan, trombospondina, prolactina, inhibidores de αvβ3, tecogalan, BAY 12-9566, AG3340, CGS27023A, COL-3, vitaxina, ZD0101, TNP-40, talidomida, escualamina, IM862, PTK787, fumagilina, análogos de fumagilina, BB-94, BB-2516, linomida, anticuerpos para factores de crecimiento vasculares, anticuerpos para receptores de factores de crecimiento vasculares o una combinación de los mismos, preferentemente el inhibidor de la angiogénesis es Avastin.
- 30 7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que el inhibidor de la angiogénesis es Avastin a una concentración de 10 mg/ml a 50 mg/ml.
8. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1.
- 35 9. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC es para administración a una dosis de 40 µg/kg a 40 mg/kg con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana.
- 40 10. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC es para administración en el plazo de 12 horas desde la administración del paclitaxel unido a albúmina, o superior a 12 horas desde la administración del paclitaxel unido a albúmina.
- 45 11. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC y el paclitaxel unido a albúmina son para administración sustancialmente simultánea.
12. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC y el paclitaxel unido a albúmina están incluidos en una forma de dosificación unitaria.
- 50 13. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC y el paclitaxel unido a albúmina son para administración intravenosa.
- 55 14. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la dosis de paclitaxel unido a albúmina es de 30 mg/m<sup>2</sup> a 1000 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana, o de 1 mg/m<sup>2</sup> a 30 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana, o de 0,3 mg/m<sup>2</sup> a 1 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana, o de 0,1 mg/m<sup>2</sup> a 0,3 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana.
- 60 15. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición reduce la tasa de crecimiento tumoral el 50 por ciento.
- 65 16. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el tumor de mamífero está seleccionado del grupo que consiste en tumores de la cavidad bucal, tumores faríngeos, tumores del aparato digestivo, los tumores del aparato respiratorio, tumores óseos, tumores cartilagosos, metástasis óseas, sarcomas, tumores de la piel, melanoma, tumores de mama, los tumores del aparato urinario, tumores de las vías urinarias, tumores orbitales, tumores cerebrales y del sistema nervioso central, gliomas, tumores del sistema endocrino, tumores de tiroides, tumores esofágicos, tumores gástricos, tumores del intestino delgado, tumores colónicos, tumores rectales, tumores anales, tumores del hígado, tumores de la vesícula biliar, tumores pancreáticos, tumores laringeos, tumores de

- pulmón, tumores bronquiales, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de pulmón de células pequeñas, tumores del cuello del útero, tumores del cuerpo uterino, tumores de ovario, tumores de vulva, tumores vaginales, tumores de próstata, carcinoma prostático, tumores testiculares, tumores del pene, tumores de la vejiga urinaria, tumores de riñón, tumores de la pelvis renal, tumores de uréter, tumores de cabeza y cuello, cáncer paratiroideo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica y tumores anales.
- 5 17. La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que el polipéptido SPARC es para administración a una dosis de 0,1 a 100 mg/kg por dosis con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana.
- 10 18. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que el inhibidor de la angiogénesis es Sutent, Avastin o una combinación de los mismos, preferentemente el inhibidor de la angiogénesis es Avastin.
- 15 19. La composición para su uso según la reivindicación 18, en la que el inhibidor de la angiogénesis es Avastin y es para administración a una dosis de 15 µg/kg a 15 mg/kg con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana.
- 20 20. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que el inhibidor de la angiogénesis es Sutent y es para administración por vía oral.
- 20 21. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la angiogénesis es para administración en el plazo de 12 horas desde la administración del paclitaxel unido a albúmina, o superior a 12 horas desde la administración del paclitaxel unido a albúmina.
- 25 22. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la angiogénesis y el paclitaxel unido a albúmina tal como taxano son para administración sustancialmente simultánea.
- 30 23. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC, inhibidor de la angiogénesis y paclitaxel unido a albúmina están incluidos en una forma de dosificación unitaria.
- 30 24. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC, el inhibidor de la angiogénesis y el paclitaxel unido a albúmina son para administración intravenosa.
- 35 25. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la combinación reduce la tasa de crecimiento tumoral al menos el 50% en comparación con la monoterapia de paclitaxel unido a albúmina.
- 40 26. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polipéptido SPARC es a una dosis de 40 µg/kg a 40 mg/kg por dosis, el inhibidor de la angiogénesis es Avastin a una dosis de 15 µg/kg a 15 mg/kg y el paclitaxel unido a albúmina es a una dosis de
- (a) de 30 mg/m<sup>2</sup> a 1000 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana,  
 (b) de 1 mg/m<sup>2</sup> a 30 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana,  
 (c) de 0,3 mg/m<sup>2</sup> a 1 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana, o  
 (d) de 0,1 mg/m<sup>2</sup> a 0,3 mg/m<sup>2</sup> con un ciclo de dosificación de al menos 1 semana.
- 45 27. La composición para su uso según la reivindicación 26, en la que el polipéptido SPARC comprende SEC ID N°: 1.
- 50 28. La composición para su uso según la reivindicación 26, en la que el polipéptido SPARC comprende SEC ID N°: 3.
29. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que polipéptido SPARC está liofilizado.
30. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el paclitaxel unido a albúmina está liofilizado.
- 55 31. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que el inhibidor de la angiogénesis es Avastin y en la que Avastin está liofilizada.

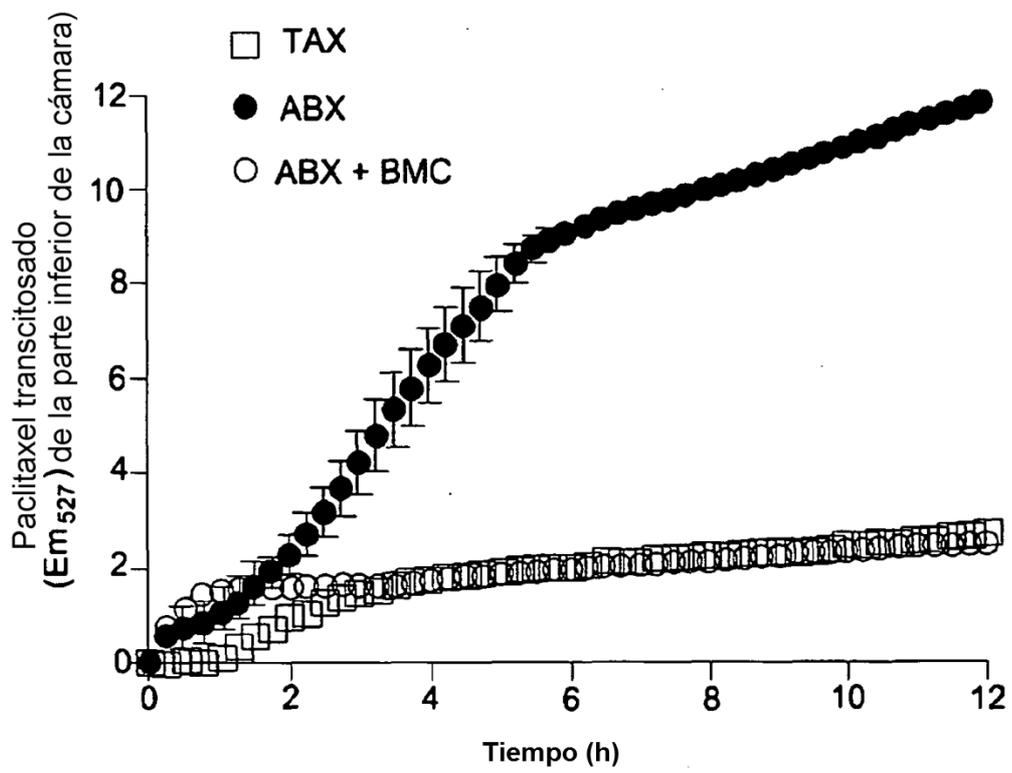
**FIG. 1**



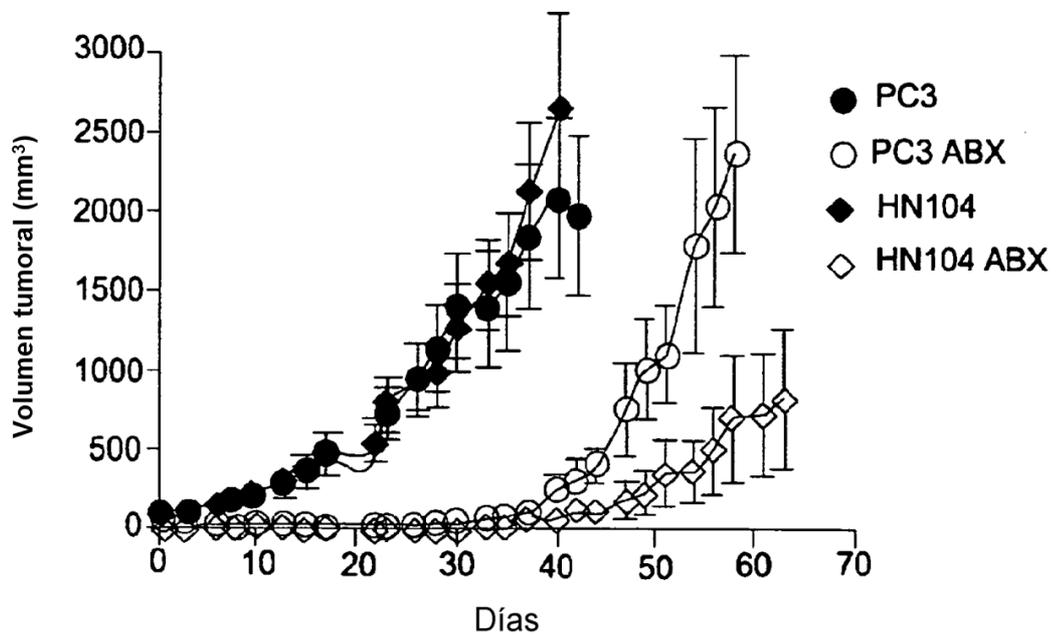
**FIG. 2**



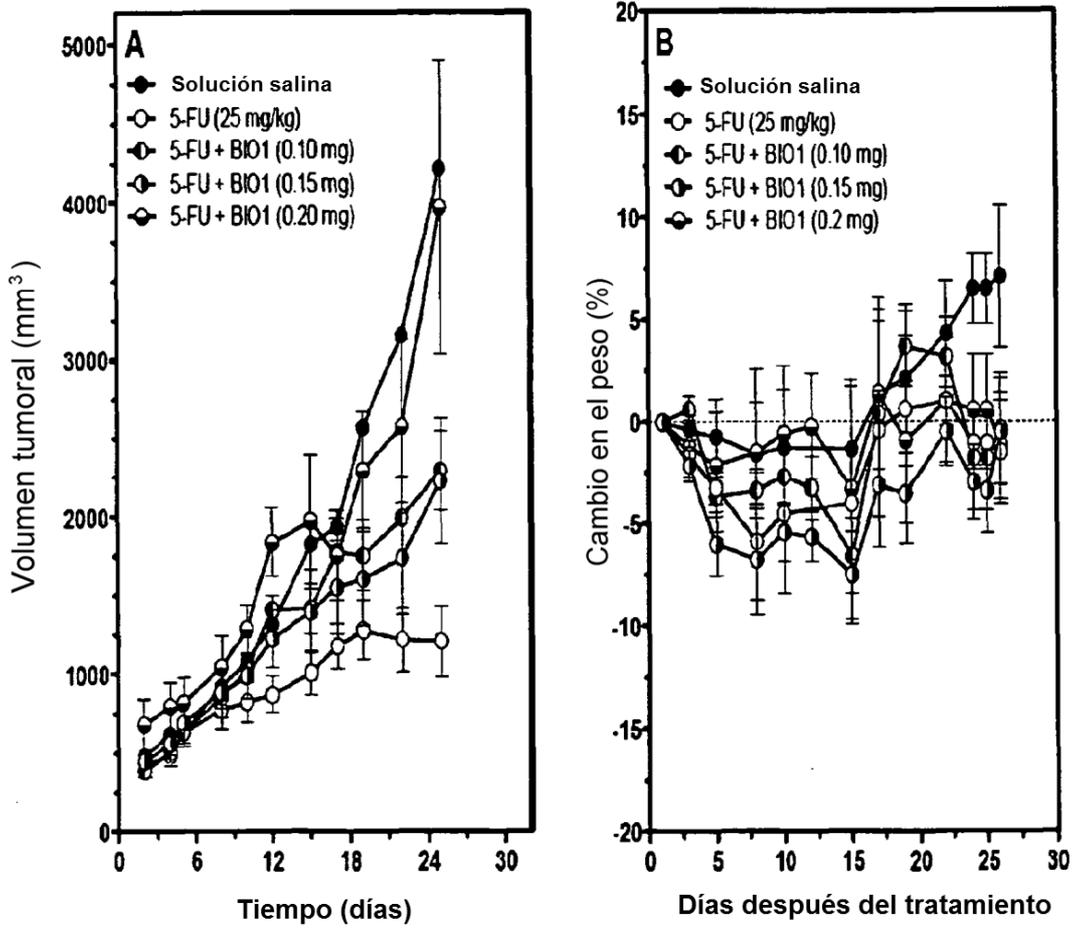
**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**

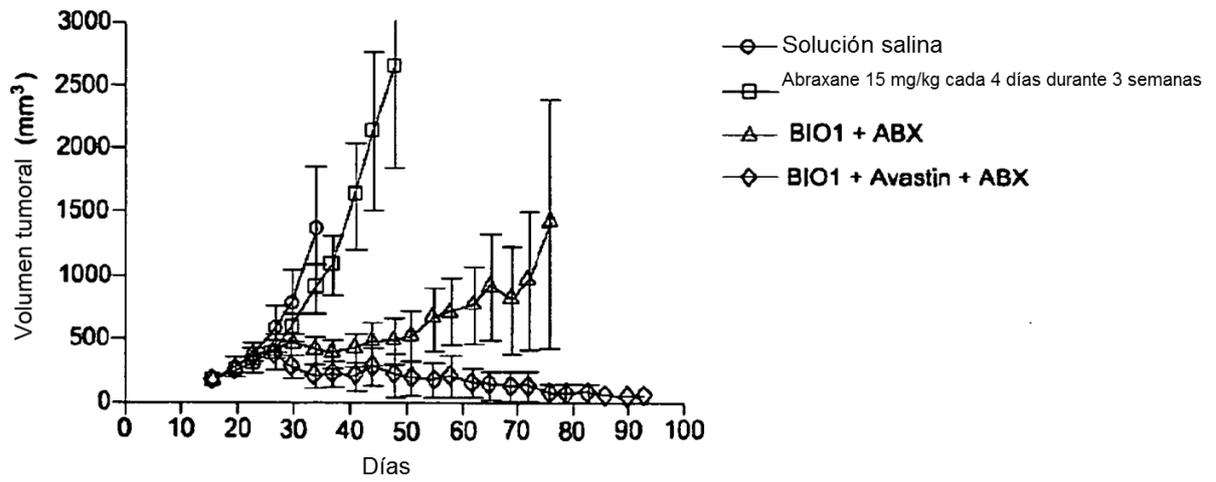
**SPARC natural:**



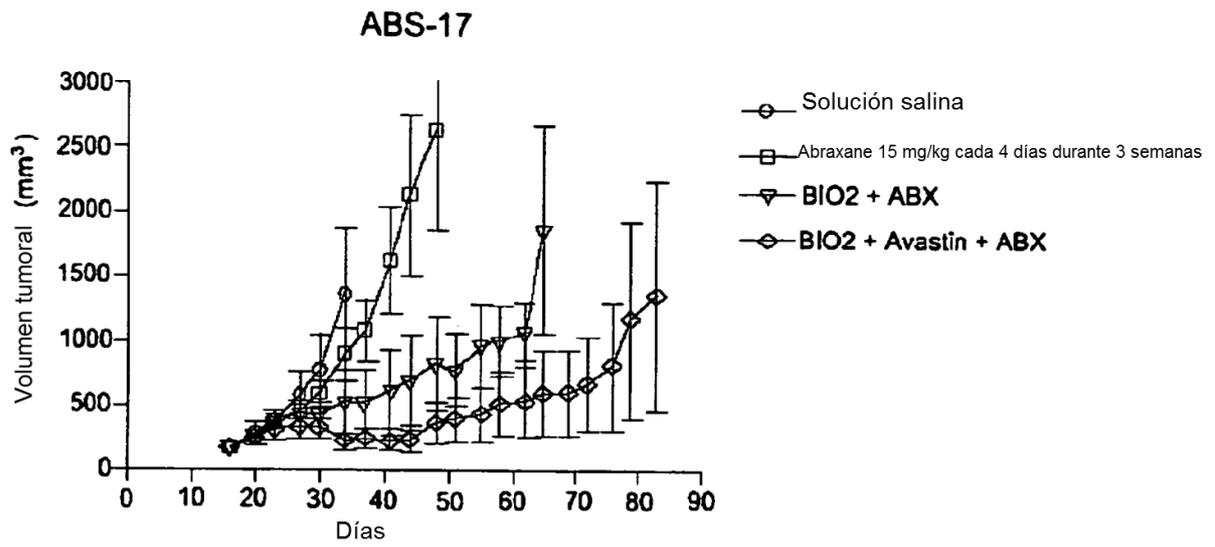
**SPARC mutante Q3:**



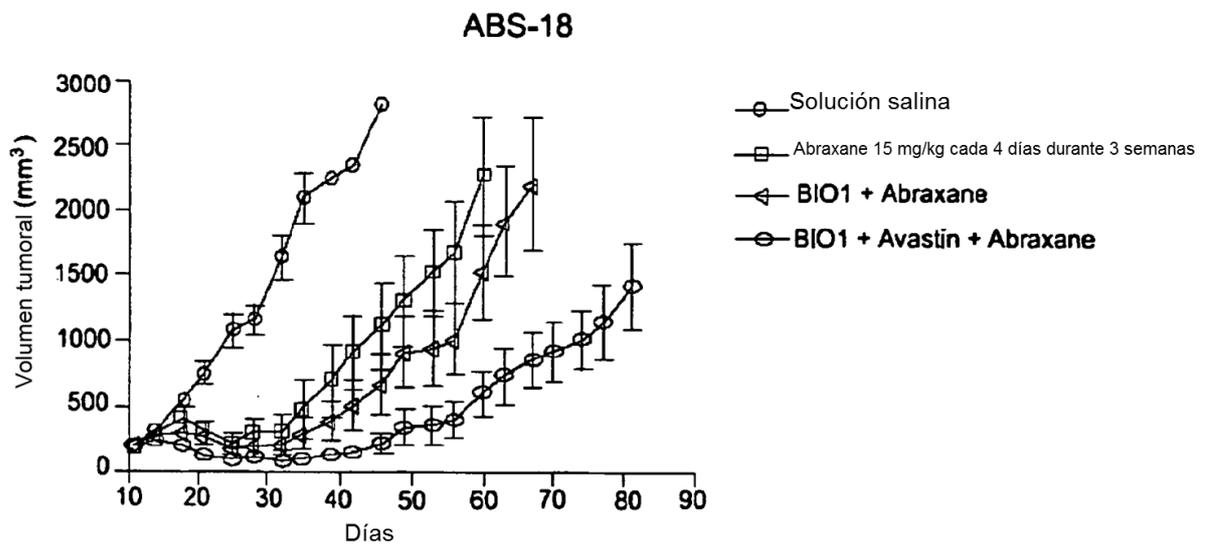
**FIG. 7**



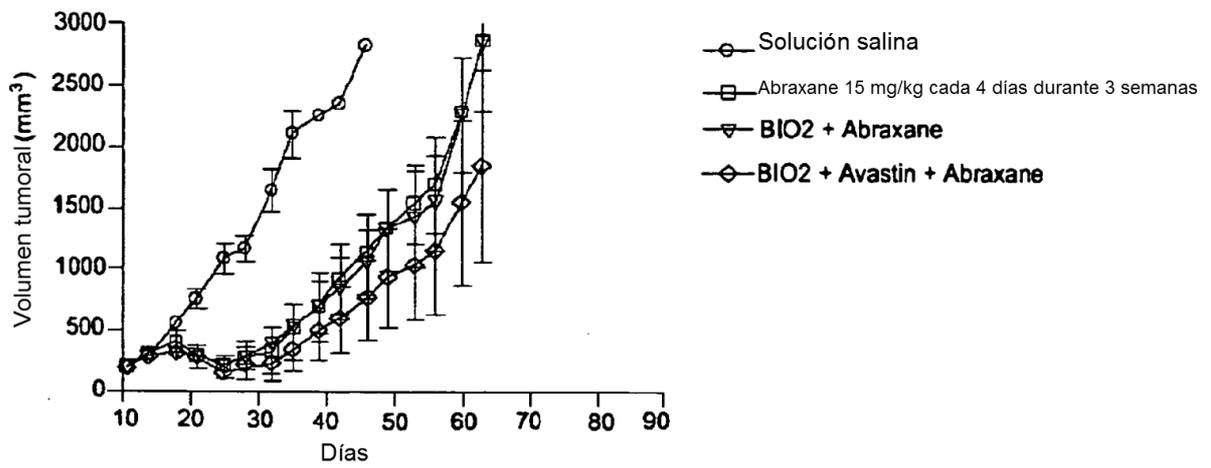
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**

