

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 343**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10781290 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2435068**

54 Título: **Uso de 2 anticuerpos anti-SPARC para predecir la respuesta a quimioterapia**

30 Prioridad:

28.05.2009 US 182081 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.04.2015

73 Titular/es:

**ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC (100.0%)
11755 Wilshire Boulevard
Los Angeles, CA 90025, US**

72 Inventor/es:

**TRIEU, VUONG;
DESAI, NEIL y
KNAUER, DANIEL**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 533 343 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

Uso de 2 anticuerpos anti-SPARC para predecir la respuesta a quimioterapia

Antecedentes de la invención

5 La proteína secretada ácida y rica en cisteína (también conocida como osteonectina, BM40 o SPARC) (a continuación en el presente documento "SPARC"), es una proteína asociada a la matriz que provoca cambios en la forma de la célula, inhibe la progresión del ciclo celular e influye en la síntesis de la matriz extracelular (Bradshaw *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 100: 6045-6050 (2003)). En 1986 se clonó el gen de SPARC murina (Mason *et al.*, EMBO J. 5: 1465-1472 (1986)) y en 1987 se clonó y secuenció un ADNc de SPARC humana de longitud completa (Swaroop *et al.*, Genomics 2: 37-47 (1988)). 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. Por ejemplo, se expresan altos niveles de proteína SPARC en huesos y dientes en desarrollo (véanse, por ejemplo, Lane *et al.*, FASEB J., 8, 163 173 (1994); Yan & Sage, J. Histochem. Cytochem. 47:1495-1505 (1999)).

15 SPARC está regulada por incremento en diversos cánceres agresivos, pero está ausente en los tejidos normales correspondientes (Porter *et al.*, J. Histochem. Cytochem., 43, 791 (1995)). La expresión de SPARC se induce entre una variedad de tumores (por ejemplo, de vejiga, hígado, ovarios, riñón, intestino y mama). En el cáncer de vejiga, por ejemplo, la expresión de SPARC se ha asociado con carcinoma avanzado. Se ha mostrado que tumores de vejiga invasivos de estadio T2 o superior expresan altos niveles de SPARC con respecto a tumores de vejiga de estadio T1 (o tumores menos superficiales), y un peor pronóstico (véase, por ejemplo, Yamanaka *et al.*, J. Urology, 166, 2495 2499 (2001)). En meningiomas, sólo se ha asociado la expresión de SPARC con tumores invasivos (véase, por ejemplo, Rempel *et al.*, Clinical Cancer Res., 5, 237 241 (1999)). También se ha detectado expresión de SPARC en el 74,5% de las lesiones de carcinoma de mama invasivo *in situ* (véase, por ejemplo, Bellahcene, *et al.*, Am. J. Pathol., 146, 95 100 (1995)), y el 54,2% de carcinoma ductal infiltrante de mama (véase, por ejemplo, Kim *et al.*, J. Korean Med. Sci., 13, 652 657 (1998)). También se ha asociado la expresión de SPARC con microcalcificación frecuente en el cáncer de mama (véase, por ejemplo, Bellahcene *et al.*, citado anteriormente), lo que sugiere que la expresión de SPARC puede ser responsable de la afinidad de las metástasis de mama por el hueso.

25 Sorprendentemente, también se ha mostrado que SPARC tiene actividad antitumoral en algunos sistemas. SPARC es un potente inhibidor del ciclo celular que detiene las células en la parte central de la fase G₁ (Yan & Sage, J. Histochem. Cytochem. 47:1495-1505 (1999)) y se ha mostrado que la expresión inducible de SPARC inhibe la proliferación de células de cáncer de mama en un sistema de modelo *in vitro* (Dhanesuan *et al.*, Breast Cancer Res. Treat. 75:73-85 (2002)). De manera similar, SPARC exógena puede reducir la proliferación de células tanto HOSE (epitelio de la superficie del ovario humano) como de cáncer de ovarios de una manera dependiente de la concentración. Además, SPARC induce la apoptosis en células de cáncer de ovarios. Se han notificado evidencias adicionales sobre receptores de SPARC presentes en células tales como células del epitelio del ovario. Se ha propuesto que es probable que la unión de SPARC a su receptor desencadene rutas de señalización específicas de tejido que median en sus funciones de supresión tumoral (Yiu *et al.*, Am. J. Pathol. 159:609-622 (2001)). También se ha notificado que SPARC purificada inhibe potentemente la angiogénesis y afecta significativamente al crecimiento tumoral de neuroblastoma en un sistema de modelo de xenoinjerto *in vivo* (Chlenski *et al.*, Cancer Res. 62:7357-7363 (2002)).

40 El documento WO2008/060651 describe el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales frente a SPARC en la predicción de la respuesta de un animal a regímenes quimioterápicos.

45 Actualmente el cáncer se trata principalmente con una o una combinación de tres tipos de terapias: cirugía, radiación y quimioterapia. Generalmente la cirugía sólo es eficaz para tratar los estadios iniciales del cáncer. Para más del 50% de los individuos con cáncer, en el momento del diagnóstico ya no son candidatos para un tratamiento quirúrgico eficaz. La radioterapia sólo es eficaz para individuos que presentan enfermedad clínicamente localizada en estadios iniciales e intermedios del cáncer, y no es eficaz para los estadios avanzados del cáncer con metástasis.

50 La quimioterapia implica la alteración de la replicación celular o el metabolismo celular. La quimioterapia puede ser eficaz, pero hay efectos secundarios intensos, por ejemplo, vómitos, recuento bajo de glóbulos blancos (WBC), caída de cabello, pérdida de peso y otros efectos tóxicos. Debido a los efectos secundarios extremadamente tóxicos, muchos individuos con cáncer no pueden terminar satisfactoriamente un régimen de quimioterapia completo. Los efectos secundarios inducidos por quimioterapia tienen un impacto significativo sobre la calidad de vida del individuo y pueden influir drásticamente en el cumplimiento del individuo con el tratamiento. Adicionalmente, los efectos secundarios adversos asociados con agentes quimioterápicos son generalmente la principal toxicidad limitante de la dosis (DLT) en la administración de estos fármacos. Por ejemplo, la mucositis es una de las principales toxicidades limitantes de la dosis para diversos agentes anticancerígenos, incluyendo los agentes citotóxicos antimetabolitos 5-FU, metotrexato, y antibióticos antitumorales, tales como doxorubicina. Muchos de estos efectos secundarios inducidos por quimioterapia, si son intensos, pueden conducir a hospitalización, o requerir tratamiento con analgésicos para el tratamiento del dolor. Algunos individuos con cáncer mueren debido a la quimioterapia a causa de una escasa tolerancia a la quimioterapia. Los efectos secundarios extremos de los fármacos anticancerígenos están provocados por la escasa especificidad de diana de tales fármacos. Los fármacos circulan a través de la

mayoría de los órganos normales de individuos así como de los tumores diana pretendidos. La escasa especificidad de diana que provoca efectos secundarios también disminuye la eficacia de la quimioterapia porque sólo una fracción de los fármacos se dirige correctamente a la diana. La eficacia de la quimioterapia se reduce adicionalmente por la escasa retención de los fármacos anticancerígenos dentro de los tumores diana.

- 5 Debido a la gravedad y propagación del cáncer, existe una gran necesidad de tratamientos eficaces de tales enfermedades o trastornos que superen los inconvenientes de la cirugía, quimioterapia y tratamiento con radiación. En particular, en vista de los graves efectos secundarios asociados con la quimioterapia, existe la necesidad de identificar qué tumores responderán o no a regímenes quimioterápicos.

Breve resumen de la invención

- 10 La invención proporciona un método para predecir la respuesta de un tumor en un animal a un régimen quimioterápico, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las diversas vistas del/de los dibujo(s)

La figura 1 muestra la curva de supervivencia global de melanoma.

La figura 2 muestra las curvas de supervivencia libre de progresión de cáncer de páncreas.

- 15 La figura 3 muestra las curvas de supervivencia global de cáncer de páncreas.

Descripción detallada de la invención

- La expresión de SPARC en el tumor es compleja, con muchos componentes que muestran expresión de SPARC incluyendo el estroma, fibroblastos, tumor, células inflamatorias, tejido normal, tejido nervioso y vasos sanguíneos. La presente invención se refiere a los componentes del patrón de expresión de SPARC total que se piensa que son responsables del impacto de SPARC sobre el pronóstico. La invención proporciona un enfoque exhaustivo para analizar la expresión de SPARC que puede predecir con mayor precisión la respuesta a terapia en un amplio espectro de cánceres.
- 20

- Tal como se usa en el presente documento, el término "tumor" se refiere a cualquier crecimiento neoplásico, proliferación o masa celular ya sea benigno o maligno (canceroso), ya sea una lesión de sitio primario o metástasis.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a un trastorno proliferativo provocado o caracterizado por la proliferación de células que han perdido su sensibilidad al control del crecimiento normal. Los cánceres del mismo tipo de tejido se originan habitualmente en el mismo tejido, y pueden dividirse en diferentes subtipos basándose en sus características biológicas. Cuatro categorías generales de cánceres son carcinoma (derivado de tejido epitelial), sarcoma (derivado de tejido conjuntivo o mesodérmico), leucemia (derivado de tejido hematopoyético) y linfoma (derivado de tejido linfoide). Se conocen más de 200 tipos diferentes de cánceres, y todos los órganos y tejidos del organismo pueden verse afectados. Los ejemplos específicos de cánceres que no limitan la definición de cáncer pueden incluir melanoma, leucemia, astrocitoma, glioblastoma, retinoblastoma, linfoma, glioma, linfoma de Hodgkin y leucemia linfocítica crónica. Los ejemplos de órganos y tejidos que pueden verse afectados por diversos cánceres incluyen páncreas, mama, tiroides, ovario, útero, testículos, próstata, tiroides, glándula hipofisaria, glándula suprarrenal, riñón, estómago, esófago o recto, cabeza y cuello, hueso, sistema nervioso, piel, sangre, tejido nasofaríngeo, pulmón, vías urinarias, cuello uterino, vagina, glándulas exocrinas y glándulas endocrinas.
- 30
- 35 Alternativamente, un cáncer puede ser multicéntrico o de sitio primario desconocido (CUPS).

- Tal como se usa en el presente documento, una "célula cancerosa" se refiere a una célula que ha experimentado un evento de transformación y cuyo crecimiento ya no se regula en la misma medida que antes de dicho evento de transformación.
- 40

- Tal como se usa en el presente documento, un "medicamento" es una composición que puede producir un efecto que puede administrarse a un paciente o sujeto de prueba. El efecto puede ser químico, biológico o físico, y el paciente o sujeto de prueba puede ser un ser humano, o un animal no humano, tal como un roedor o ratón transgénico. La composición puede incluir moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas con una composición molecular diferenciada preparadas sintéticamente, encontradas en la naturaleza o de origen sintético parcial. En este grupo se incluyen nucleótidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas o complejos que comprenden al menos una de estas entidades. El medicamento puede estar compuesto por la composición eficaz sola o en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45

- Tal como se usa en el presente documento, un "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos, antimicrobianos o antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El excipiente puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal u oral. El excipiente puede incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En la técnica se conoce el uso de tales medios para la preparación de medicamentos.
- 50
- 55

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad farmacológicamente eficaz” de un medicamento se refiere a usar una cantidad de un medicamento presente en una concentración tal que da como resultado un nivel terapéutico del fármaco administrado a lo largo del plazo en el que se usa el fármaco. Esto puede depender del modo de administración, el periodo de tiempo de la dosificación, la edad, el peso, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto que recibe el medicamento. La determinación de qué dosis es una “cantidad farmacológicamente eficaz” requiere optimización rutinaria, lo cual está dentro de las habilidades de un experto habitual en la técnica.

Un cáncer o una célula cancerosa puede describirse como “sensible a” o “resistente a” un régimen terapéutico o agente quimioterápico dado basándose en la capacidad del régimen para destruir células cancerosas o disminuir el tamaño tumoral, reducir el crecimiento de cáncer global (es decir, mediante reducción de la angiogénesis) y/o inhibir la metástasis. Las células cancerosas que son resistentes a un régimen terapéutico no pueden responder al régimen y pueden continuar proliferando. Las células cancerosas que son sensibles a un régimen terapéutico pueden responder al régimen dando como resultado muerte celular, una reducción del tamaño tumoral, reducción del crecimiento global (carga tumoral) o inhibición de la metástasis.

Los términos “tratar”, “tratamiento”, “terapia” y “tratamiento terapéutico” tal 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 disminución de la posibilidad de una enfermedad seleccionada como diana (por ejemplo, cáncer u otra enfermedad proliferativa) o estado relacionado con la misma. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la enfermedad o el estado así como aquellos propensos a tener la enfermedad o el estado que va a prevenirse. Los términos “tratar”, “tratamiento”, “terapia” y “tratamiento terapéutico” tal como se usan en el presente documento también describen el manejo y cuidado de un mamífero con el fin de combatir una enfermedad, o estado relacionado, e incluyen la administración de una composición para aliviar los síntomas, efectos secundarios u otras complicaciones de la enfermedad, el estado. El tratamiento terapéutico para el cáncer incluye, pero no se limita a, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia génica, inmunoterapia, regímenes terapéuticos alternativos, y combinaciones de los mismos.

Tal 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 animales (particularmente de mamífero) que se sospecha que tienen propiedades terapéuticas. El agente o fármaco puede estar purificado, sustancialmente purificado o parcialmente purificado. Un “agente” según la presente invención también incluye un agente de radioterapia o un “agente quimioterápico”.

Tal como se usa en el presente documento, “quimioterapia” se refiere a la administración de al menos un agente quimioterápico que es dañino para destruir células cancerosas. Hay una miríada de tales agentes quimioterápicos disponibles para un médico. Los agentes quimioterápicos pueden administrarse a un sujeto en una única dosis en bolo o pueden administrarse en dosis más pequeñas a lo largo del tiempo. Puede usarse un único agente quimioterápico (terapia con un agente individual) o puede usarse más de un agente en combinación (terapia de combinación). La quimioterapia puede usarse sola para tratar algunos tipos de cáncer. Alternativamente, la quimioterapia puede usarse en combinación con otros tipos de tratamiento, por ejemplo, radioterapia o terapias alternativas (por ejemplo, inmunoterapia) tal como se describe en el presente documento. Adicionalmente, puede administrarse un quimiosensibilizador como terapia de combinación con un agente quimioterápico.

Tal como se usa en el presente documento, un “agente quimioterápico” o “fármaco anticancerígeno” se refiere a un medicamento que puede usarse para tratar el cáncer, y generalmente tiene la capacidad de destruir células cancerosas directamente. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, hormonas y antagonistas, y agentes diversos. Se indican ejemplos de nombres alternativos entre paréntesis. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostazas nitrogenadas tales como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina) y clorambucilo; etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina y tiotepa; sulfonatos de alquilo tales como busulfano; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), semustina (metil-CCNU), lomustina (CCNU) y estreptozocina (estreptozotocina); antagonistas de la síntesis del ADN tales como fosfato de estramustina; y triazinas tales como dacarbazina (DTIC, dimetil-triazenoimidazolcarboxamida) y temozolomida. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen análogos del ácido fólico tales como metotrexato (ametopterina); análogos de pirimidina tales como fluorouracilo (5-fluorouracilo, 5-FU, 5FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina, FUdR), citarabina (arabinósido de citosina) y gemcitabina; análogos de purina tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina, 6-MP), tioguanina (6-tioguanina, TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina, desoxicoformicina), cladribina y fludarabina; e inhibidores de topoisomerasas tales como amsacrina. Los ejemplos de productos naturales incluyen alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; taxanos tales como paclitaxel y docetaxel (Taxotere); epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; camptotecinas tales como topotecán e irinotecán; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina, rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, mitomicina (mitomicina C), idarubicina, epirubicina; enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como interferón alfa e interleucina 2. Los ejemplos de hormonas y antagonistas incluyen agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante tales como buserelina; adrenocorticosteroides tales como prednisona y preparaciones relacionadas; progestinas tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógenos tales como dietilestilbestrol y etinil-estradiol y preparaciones relacionadas; antagonistas de estrógenos tales como tamoxifeno y

5 anastrozol; andrógenos tales como propionato de testosterona y fluoximesterona y preparaciones relacionadas; antagonistas de andrógenos tales como flutamida y bicalutamida; y análogos de la hormona liberadora de gonadotropina tales como leuprolida. Los ejemplos de agentes diversos incluyen talidomida; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (cis-DDP), oxaliplatino y carboplatino; antracenedionas tales como mitoxantrona; ureas sustituidas tales como hidroxiaurea; derivados de metilhidrazina tales como procarbazona (N-metilhidrazina, MIH); supresores corticosuprarrenales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; agonistas de RXR tales como bexaroteno; e inhibidores de tirosina cinasas tales como imatinib. El experto en la técnica conocer nombres alternativos y nombres comerciales de estos y otros ejemplos de agentes quimioterápicos, y sus métodos de uso incluyendo pautas posológicas y regímenes de administración. En particular, los agentes quimioterápicos adecuados para su uso según la invención incluyen, sin limitación, paclitaxeles nanoparticulados unidos a albúmina.

15 Abraxane™, también conocido como ABI-007, es un agente quimioterápico preferido. Abraxane™ es una formulación nanoparticulada unida a albúmina de paclitaxel. El uso de un producto nanoparticulado de albúmina como vehículo da como resultado la formación de un coloide cuando se reconstituye con solución salina. Basándose en estudios clínicos, se ha mostrado que el uso de Abraxane™ se caracteriza por reacciones de hipersensibilidad reducidas en comparación con Taxol™. Por consiguiente, no se requiere medicación previa para pacientes que reciben Abraxane™.

20 Otra ventaja de la formulación nanoparticulada de albúmina es que, excluyendo los emulsionantes tóxicos, es posible administrar dosis superiores de paclitaxel a intervalos más frecuentes de lo que es posible con Taxol™. Existe la posibilidad de que pueda observarse una eficacia potenciada en tumores sólidos como consecuencia de (i) dosis tolerables superiores (300 mg/m²), (ii) semivida más larga, (iii) disponibilidad prolongada en tumor local y/o (iv) liberación *in vivo* sostenida de Abraxane™.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "régimen radioterapéutico" o "radioterapia" se refiere a la administración de radiación para destruir células cancerosas. La radiación interacciona con diversas moléculas dentro de la célula, pero la diana principal, que da como resultado la muerte celular, es el ácido desoxirribonucleico (ADN). Sin embargo, con frecuencia la radioterapia también da como resultado daño a las membranas celulares y nucleares y a otros orgánulos. El daño del ADN implica habitualmente roturas de cadena sencilla y de doble cadena en la estructura principal de azúcar-fosfato. Además, puede haber reticulación del ADN y proteínas, lo cual puede alterar la función de la célula. Dependiendo del tipo de radiación, el mecanismo de daño del ADN puede variar al igual que la eficacia biológica relativa. Por ejemplo, las partículas pesadas (es decir, protones, neutrones) dañan el ADN directamente y tienen una mayor eficacia biológica relativa. La radiación electromagnética da como resultado ionización indirecta que actúa a través de radicales libres de hidroxilo de corta duración producidos principalmente por la ionización de agua celular. Las aplicaciones clínicas de la radiación consisten en radiación por haces externos (desde una fuente exterior) y braquiterapia (usando una fuente de radiación implantada o insertada en el paciente). La radiación por haces externos consiste en rayos X y/o rayos gamma, mientras que la braquiterapia emplea núcleos radiactivos que se descomponen y emiten partículas alfa, o partículas beta junto con rayos gamma.

35 La radioterapia puede usarse además en quimioterapia de combinación, actuando el agente quimioterápico como radiosensibilizador. La elección específica de radioterapia adecuada para un paciente individual puede determinarla un experto en el centro de atención, teniendo en cuenta el tejido y el estadio del cáncer.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "régimen terapéutico alternativo" o "terapia alternativa" puede incluir, por ejemplo, modificadores de la respuesta biológica (incluyendo modificadores de la respuesta biológica de polipéptidos, hidratos de carbono y lípidos), toxinas, lectinas, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina cinasas receptoras (por ejemplo Iressa™ (gefitinib), Tarceva™ (erlotinib), Erbitux™ (cetuximab), mesilato de imatinib (Gleevec™), inhibidores del proteosoma (por ejemplo, bortezomib, Velcade™); inhibidores de VEGFR2 tales como PTK787 (ZK222584), inhibidores de aurora cinasas (por ejemplo, ZM447439); inhibidores de diana de rapamicina de mamífero (mTOR), inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2), inhibidores de rapamicina (por ejemplo, sirolimús, Rapamune™); inhibidores de la farnesiltransferasa (por ejemplo, tipifarnib, Zarnestra); inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, BAY 12-9566; polisacárido sulfatado tecogalán); inhibidores de la angiogénesis (por ejemplo Avastin™ (bevacizumab); análogos de fumagilina tales como TNP-4; carboxiaminotriazol; BB-94 y BB-2516; talidomida; interleucina-12; linomida; fragmentos peptídicos; y anticuerpos frente a factores de crecimiento vasculares y receptores de factores de crecimiento vasculares); inhibidores de receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas, inhibidores de proteína cinasa C, inhibidores de cinasas activadas por mitógenos, inhibidores de proteínas cinasas activadas por mitógenos, inhibidores del oncogén transformante del virus del sarcoma de Rous (SRC), inhibidores de la histonadesacetilasa, inhibidores de factores inducibles por hipoxia pequeños, inhibidores de hedgehog e inhibidores de señalización de TGF-β. Además, un agente inmunoterápico también se considerará un régimen terapéutico alternativo. Los ejemplos incluyen quimiocinas, quimiotaxinas, citocinas, interleucinas o factor tisular. Los agentes inmunoterápicos adecuados también incluyen globulina sérica o gamma-globulina que contiene anticuerpos previamente formados; adyuvantes inmunoestimulantes no específicos; inmunoterapia específica activa; e inmunoterapia adoptiva. Además, las terapias alternativas pueden incluir otras entidades químicas de base biológica tales como polinucleótidos, incluyendo moléculas antisentido, polipéptidos, anticuerpos, vectores de terapia génica y similares. Tales productos terapéuticos alternativos pueden administrarse solos o en combinación, o en combinación con otros regímenes terapéuticos

descritos en el presente documento. Un médico experto en la técnica conocerá nombres alternativos y nombres comerciales de estos agentes usados en regímenes terapéuticos alternativos y ejemplos adicionales de agentes usados en regímenes terapéuticos alternativos, y sus métodos de uso incluyendo pautas posológicas y regímenes de administración. Además, un experto en la técnica también conocerá métodos de uso de agentes quimioterápicos y otros agentes usados en regímenes terapéuticos alternativos en terapias de combinación, incluyendo pautas posológicas y regímenes de administración.

En particular, los regímenes terapéuticos alternativos adecuados incluyen, sin limitación, anticuerpos frente a moléculas en la superficie de células cancerosas tales como anticuerpos frente a Her2 (por ejemplo, trastuzumab), EGF o receptores de EGF, VEGF (por ejemplo, bevacizumab) o receptores de VEGF, CD20, y similares. El agente terapéutico puede comprender además cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo que media en una o más de activación del complemento, citotoxicidad mediada por células, inducción de apoptosis, inducción de muerte celular y opsonización. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de este tipo puede ser un dominio Fc completo o parcial.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sección histológica” se refiere a una sección delgada de una muestra tisular adecuada para montarla sobre un portaobjetos de microscopio y teñirla con cualquier protocolo adecuado. Tal como se usa en el presente documento, “inmunotañir una sección histológica” se refiere a la tinción de las células y la matriz intracelular de la sección histológica resultante de la unión de anticuerpos a componentes de las células y la matriz intracelular. Tal como se usa en el presente documento, para teñir “de manera predominante” o “de manera preferente” una estructura, por ejemplo, una célula cancerosa con respecto a un fibroblasto, la inmunotinción de la estructura teñida de manera preferente en la sección histológica debe tener una intensidad de 3/3 cuando se observa al microscopio por los expertos en la técnica, mientras que todas las demás estructuras sólo se tiñen con una intensidad de 1/3 o muestran una tinción de 0/3 (sin tinción).

Tal como se usa en el presente documento, el término “epítopo” se refiere a la estructura tridimensional a la que se une un anticuerpo, y en particular la secuencia de aminoácidos seleccionada como diana por el anticuerpo. Tal como se usa en el presente documento, el término “epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal MAB941” se refiere a la secuencia de aminoácidos en SPARC a la que se une el anticuerpo monoclonal MAB941. (Anticuerpo monoclonal frente a SPARC (R&D Systems, Minneapolis, MN), n.º de catálogo MAB941).

Tal como se usa en el presente documento, “epítopos inmunodominantes” se refieren a las estructuras tridimensionales a las que se unen con la mayor avidéz colectiva los antisueros policlonales de anticuerpos adquiridos. En particular, los epítopos responsables del patrón de tinción en el protocolo de inmunotinción que emplea esos antisueros policlonales. Tal como se usa en el presente documento, el término “epítopos de SPARC inmunodominantes reconocidos por el anticuerpo policlonal AF941” se refiere a los péptidos y a las secuencias de aminoácidos de SPARC encontrados con mayor avidéz por los antisueros policlonales AF941. Por consiguiente, la unión a, y tinción de, estos péptidos y secuencias de aminoácidos de SPARC da como resultado la mayoría de la inmunotinción observada. (Anticuerpo policlonal frente a SPARC (R&D Systems, Minneapolis, MN), n.º de catálogo AF941).

Por “anticuerpos” quiere decirse, sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que puede reconocer y unirse a un antígeno específico. Un antígeno diana tiene generalmente numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. Por tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno de una diana de interés o parte del mismo. Las dianas incluyen células cancerosas u otras células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria.

Las inmunoglobulinas dadas a conocer en el presente documento pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, que mantiene la actividad biológica deseada. Los “fragmentos de anticuerpo” son generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de complementariedad), y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores que se unen de manera inmuno-específica a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales a los que se hace referencia en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente estadounidense n.º 4.816.567). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo o simio) y secuencias de región constante humanas.

La “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células principales para mediar en ADCC, las células NK, sólo expresan Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro* (patente estadounidense n.º 5.003.621; patente estadounidense n.º 5.821.337). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK).

Un anticuerpo que “induce muerte celular” es uno que provoca que una célula viable se vuelva no viable. La muerte celular *in vitro* puede determinarse en ausencia de complemento y células efectoras inmunitarias para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Por tanto, el ensayo para detectar la muerte celular puede realizarse usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunitarias. Para determinar si el anticuerpo puede inducir muerte celular, puede evaluarse la pérdida de integridad de la membrana según se evalúa mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul trípano o 7AAD con respecto a células sin tratar. Los anticuerpos que inducen muerte celular son aquellos que inducen captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

Un anticuerpo que “induce apoptosis” es uno que induce muerte celular programada según se determina mediante unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos).

Tal como se usa en el presente documento, un “quimiosensibilizador” o “sensibilizador” es un medicamento que puede potenciar el efecto terapéutico de un agente quimioterápico, tratamiento de radioterapia o régimen terapéutico alternativo, y por tanto mejorar la eficacia de tal tratamiento o agente. La sensibilidad o resistencia de una célula tumoral o cancerosa al tratamiento también puede medirse en un animal, tal como un ser humano o roedor, por ejemplo, midiendo el tamaño tumoral, la carga tumoral o la incidencia de metástasis a lo largo de un periodo de tiempo. Por ejemplo, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 6 meses para un ser humano y aproximadamente 2-4, aproximadamente 3-5 o aproximadamente 4-6 semanas para un ratón. Una composición o un método de tratamiento puede sensibilizar la respuesta de una célula tumoral o cancerosa a un tratamiento terapéutico si el aumento de la sensibilidad al tratamiento o la reducción de la resistencia es de aproximadamente el 10% o más, por ejemplo, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, o más, a aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces o más, en comparación con la sensibilidad o resistencia al tratamiento en ausencia de tal composición o método. La determinación de la sensibilidad o resistencia a un tratamiento terapéutico es rutinaria en la técnica y está dentro de las habilidades del experto en la técnica.

Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” pueden usarse de manera intercambiable, y se refieren a un compuesto que comprende al menos dos residuos de aminoácido unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, por ejemplo isómeros peptídicos (enlaces peptídicos modificados) que pueden proporcionar propiedades deseadas adicionales al péptido, tales como semivida aumentada. Un péptido puede comprender al menos dos aminoácidos. Los aminoácidos que comprenden un péptido o una proteína descritos en el presente documento también pueden modificarse o bien mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o bien mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Pueden producirse modificaciones en cualquier parte en un péptido, incluyendo la estructura principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo-terminales. Se entiende que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o grados variables en varios sitios en un péptido dado.

Métodos

La presente invención proporciona métodos para predecir la respuesta de un tumor en un animal a un régimen quimioterápico tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método que comprende (a) aplicar un primer anticuerpo anti-SPARC a una sección histológica del tumor, en el que el primer anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en células tumorales; (b) aplicar un segundo anticuerpo anti-SPARC a la sección histológica de (a) o una segunda sección histológica del tumor, en el que el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en fibroblastos; y (c) predecir una respuesta positiva al régimen quimioterápico si el primer anticuerpo anti-SPARC y el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñen la sección o secciones histológicas.

En otras realizaciones, la invención proporciona un método que comprende (a) aplicar un primer anticuerpo anti-SPARC a una sección histológica del tumor, en el que el primer anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en células tumorales; (b) aplicar un segundo anticuerpo anti-SPARC a la sección histológica de (a) o una segunda sección histológica del tumor, en el que el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en fibroblastos; y (c) predecir una respuesta positiva al régimen quimioterápico si el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe la sección histológica a la que se aplica.

En una realización adicional, la invención proporciona un método que comprende (a) aplicar un anticuerpo anti-SPARC a una sección histológica del tumor, en el que el anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en células tumorales; y (b) predecir una respuesta negativa al régimen quimioterápico si el anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe la sección o secciones histológicas. Más particularmente, la inmunotinción de células tumorales mediante un anticuerpo anti-SPARC que inmunotiñe de manera preferente SPARC en células tumorales (tal como MAB941 u otro anticuerpo que reconoce un epítipo de SPARC reconocido por MAB941) puede predecir un desenlace negativo. En realizaciones preferidas para predecir una respuesta negativa, el tumor es un carcinoma de páncreas y el régimen quimioterápico es paclitaxel unido a albúmina nanoparticulado solo o en combinación con gemcitabina. Sin embargo, se entenderá que cualquier tumor canceroso sólido puede evaluarse según este método.

En algunas realizaciones, el primer anticuerpo anti-SPARC reconoce un epítipo de SPARC reconocido por el anticuerpo MAB941. Por ejemplo, el primer anticuerpo anti-SPARC puede ser el anticuerpo MAB941. Sin embargo, se entenderá que en la presente invención también pueden usarse otros anticuerpos anti-SPARC que pueden unirse a este epítipo con especificidad. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo anti-SPARC reconoce un epítipo de SPARC reconocido por el anticuerpo AF941, preferiblemente el epítipo de SPARC inmunodominante reconocido por el anticuerpo AF941. Por ejemplo, el segundo anticuerpo anti-SPARC puede ser el anticuerpo AF941.

Sin embargo, se entenderá que en la presente invención también pueden usarse otros anticuerpos anti-SPARC que pueden unirse a este epítipo con especificidad. Puede realizarse mapeo de epítopos usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, los protocolos de "Epitope Mapping", capítulo 11, en Using Antibodies por Ed Harlow y David Lane. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU., 1999. Mediante mapeo de los epítopos, pueden generarse fácilmente anticuerpos específicos de epítipo mediante técnicas convencionales.

Pueden identificarse anticuerpos anti-SPARC adecuados usando micromatrices tisulares para someter a ensayo la correcta distribución de tinción de SPARC en tumor y fibroblastos. Pueden prepararse micromatrices tisulares usando cualquier método conocido por un experto habitual en la técnica. Pueden usarse anticuerpos monoclonales y policlonales preparados mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica. También pueden prepararse anticuerpos que tienen especificidad tanto para SPARC de tumor como SPARC de fibroblastos. En los métodos de la presente invención se prefiere particularmente un anticuerpo biespecífico u otro anticuerpo que tiene especificidad doble por epítopos identificados en el presente documento.

Las terapias de combinación descritas en la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, administración de anticuerpos, administración de vacunas, administración de agentes citotóxicos, polipéptidos de aminoácidos naturales, ácidos nucleicos, análogos de nucleótidos y modificadores de la respuesta biológica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o de manera secuencial. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, hormonas y antagonistas, y agentes diversos. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostazas nitrogenadas tales como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcosina) y clorambucilo; etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina y tiotepa; sulfonatos de alquilo tales como busulfano; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), semustina (metil-CCNU), lomustina (CCNU) y estreptozocina (estreptozotocina); antagonistas de la síntesis del ADN tales como fosfato de estramustina; y triazinas tales como dacarbazina (DTIC, dimetil-triazenoimidazolcarboxamida) y temozolomida. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen análogos del ácido fólico tales como metotrexato (ametopterina); análogos de pirimidina tales como fluorouracilo (5-fluorouracilo, 5-FU, 5FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina, FUDR), citarabina (arabinósido de citosina) y gemcitabina; análogos de purina tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina, 6-MP), tioguanina (6-tioguanina, TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina, desoxicoformicina), cladribina y fludarabina; e inhibidores de topoisomerasas tales como amsacrina. Los ejemplos de productos naturales incluyen alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; taxanos tales como paclitaxel (Abraxane™) y docetaxel (Taxotere™); epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; camptotecinas tales como topotecán e irinotecán; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina, rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, mitomicina (mitomicina C), idarubicina, epirubicina; enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como interferón alfa e interleucina 2. Los ejemplos de hormonas y antagonistas incluyen agonistas de la hormona liberadora de hormona

luteinizante tales como buserelina; adrenocorticosteroides tales como prednisona y preparaciones relacionadas; progestinas tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógenos tales como dietilestilbestrol y etinil-estradiol y preparaciones relacionadas; antagonistas de estrógenos tales como tamoxifeno y anastrozol; andrógenos tales como propionato de testosterona y fluoximesterona y preparaciones relacionadas; antagonistas de andrógenos tales como flutamida y bicalutamida; y análogos de la hormona liberadora de gonadotropina tales como leuprolida. Los ejemplos de agentes diversos incluyen talidomida; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (cis-DDP), oxaliplatino y carboplatino; antracenedionas tales como mitoxantrona; ureas sustituidas tales como hidroxurea; derivados de metilhidrazina tales como procarbazona (N-metilhidrazina, MIH); supresores corticosuprarrenales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; agonistas de RXR tales como bexaroteno; e inhibidores de tirosina cinasas tales como imatinib.

Se entenderá que la determinación de si un anticuerpo anti-SPARC inmunotíñe o no una sección histológica, es decir, si una sección histológica es positiva para SPARC o no, queda dentro de la habilidad de un experto habitual en la técnica. En algunas realizaciones, el nivel de inmunotinción puede cuantificarse usando cualquier método convencional en patología, de tal manera que se entenderá que cualquier nivel de inmunotinción por encima de un nivel predeterminado constituye una muestra positiva para SPARC. Por ejemplo, la inmunotinción puede evaluarse en una escala de 0-3, en la que 0 = negativo (<5% de las células con tinción), 1 = muy débil, 2 = tinción moderada (es decir el 5-50% de las células muestran tinción con intensidad de débil a intermedia en una distribución subcelular apropiada), 3 = tinción fuerte (es decir, el 5% de las células muestran tinción muy intensa o >50% de las células muestran tinción de débil a moderadamente intensa, en una distribución subcelular apropiada). Preferiblemente, cuando se usa tal escala, se determina que una muestra es positiva para SPARC cuando la puntuación es de 3. En otras realizaciones, puede determinarse que una muestra es positiva para SPARC cuando la puntuación es de 2 o incluso de 1. En otras realizaciones, el nivel de inmunotinción puede determinarse de manera cualitativa, por ejemplo, mediante comparación con muestras de control positivas o negativas. Por ejemplo, si una sección histológica muestra inmunotinción igual o superior a una muestra que se determinó anteriormente o por separado que es positiva para SPARC, entonces se entenderá que la sección histológica es positiva para SPARC. De manera similar, si una sección histológica muestra una inmunotinción igual o inferior a una muestra que se determinó anteriormente o por separado que es negativa para SPARC, entonces se entenderá que la sección histológica es negativa para SPARC. Asimismo, un experto habitual en la técnica podrá determinar si una sección histológica que muestra inmunotinción entre la de una muestra positiva para SPARC conocida y una muestra negativa para SPARC conocida debe caracterizarse como positiva para SPARC o negativa para SPARC.

La puntuación o evaluación cualitativa de la inmunotinción de SPARC puede usarse para predecir una respuesta positiva o negativa al régimen quimioterápico. Una respuesta positiva tal como se predice en los métodos de la presente invención incluye, pero no se limita a, respuesta patológica (reducción del tamaño o la carga tumoral), supervivencia global, o supervivencia libre de progresión tal como se muestra mediante una mejora de la métrica en al menos el 5%, preferiblemente en al menos el 10%, más preferiblemente en al menos el 15%, incluso más preferiblemente en al menos el 20%, lo más preferiblemente en al menos el 25% o más. Alternativamente, la métrica muestra una mejora en una cantidad estadísticamente significativa en comparación con ausencia de terapia o terapia previa o alternativa. La respuesta negativa incluye, pero no se limita a, progresión patológica, disminución de la supervivencia global o disminución de la supervivencia libre de progresión.

El tumor puede ser cualquier tipo de tumor conocido por un experto habitual en la técnica. En realizaciones preferidas, el tumor es un tumor canceroso sólido. Los tumores a modo de ejemplo que pueden evaluarse o tratarse en los presentes métodos pueden incluir tumores de la cavidad oral, tumores faríngeos, tumores del sistema digestivo, tumores del sistema respiratorio, tumores óseos, tumores cartilagosos, metástasis óseas, sarcomas, tumores de piel, melanoma, tumores de mama, tumores del aparato genital, tumores de las vías urinarias, tumores orbitales, tumores del cerebro y el sistema nervioso central, gliomas, tumores del sistema endocrino, tumores de tiroides, tumores de esófago, tumores gástricos, tumores del intestino delgado, tumores de colon, tumores rectales, tumores anales, tumores de hígado, tumores de vesícula biliar, tumores de páncreas, tumores de laringe, tumores del pulmón, tumores bronquiales, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de pulmón de células pequeñas, tumores de cuello uterino, tumores de cuerpo uterino, tumores de ovarios, tumores de vulva, tumores de vagina, tumores de próstata, carcinoma de próstata, tumores de testículos, tumores del pene, tumores de vejiga urinaria, tumores del riñón, tumores de la pelvis renal, tumores de la uretra, tumores de cabeza y cuello, cáncer de paratiroides, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica y tumores anales. En los presentes métodos también se prefieren tumores positivos para receptor de estrógenos (ER+). En las realizaciones más preferidas, el tumor es un melanoma, un tumor de mama, un tumor de cabeza y/o cuello o un carcinoma de páncreas.

Los regímenes quimioterápicos contemplados pueden incluir cualquier tratamiento quimioterápico o fármaco anticancerígeno tal como se indicó anteriormente. En algunas realizaciones, el régimen quimioterápico comprende un taxano. En realizaciones preferidas, el régimen quimioterápico comprende paclitaxel. En realizaciones preferidas, el régimen quimioterápico se selecciona según el tipo de cáncer y/o tumor. Por ejemplo, cuando el tumor es un carcinoma de páncreas, el régimen quimioterápico comprende paclitaxel, preferiblemente paclitaxel unido a albúmina nanoparticulado (Abraxane™), gemcitabina, o combinaciones de los mismos. Cuando el tumor es melanoma, el régimen quimioterápico comprende paclitaxel, preferiblemente paclitaxel unido a albúmina

nanoparticulado (Abraxane™), carboplatino, o combinaciones de los mismos. Cuando el tumor es positivo para receptor de estrógenos, el régimen quimioterápico puede comprender paclitaxel, preferiblemente paclitaxel unido a albúmina nanoparticulado (Abraxane™), un antagonista de estrógenos o terapia de ablación ER+, o combinaciones de los mismos.

- 5 Los métodos descritos según la solicitud incluyen, por ejemplo, terapias de combinación en las que el animal también está sometido a una o más terapias contra el cáncer seleccionadas del grupo que consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia, termoterapia, inmunoterapia, terapia hormonal y terapia con láser. Los términos “administración conjunta” y “terapia de combinación” se refieren a administrar a un sujeto dos o más agentes terapéuticamente activos. Los agentes pueden estar contenidos en una única composición farmacéutica y pueden administrarse al mismo tiempo, o los agentes pueden estar contenidos en formulaciones separadas y administrarse en serie a un sujeto. Siempre que los dos agentes puedan detectarse en el sujeto al mismo tiempo, se dice que los dos agentes se administran conjuntamente.

- 10 La administración de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación puede lograrse mediante cualquier vía adecuada incluyendo, pero sin limitarse a, administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intratumoral, oral, rectal, vaginal, intravesical y por inhalación, siendo las más preferidas la administración intravenosa e intratumoral. La composición puede comprender además cualquier otro componente adecuado, especialmente para potenciar la estabilidad de la composición y/o su uso final. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición de la invención. Las siguientes formulaciones y métodos son simplemente a modo de ejemplo y no son en ningún modo limitativos.

- 15 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir, si se desea, 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, tales como ibuprofeno o esteroides, pueden ser parte de la composición para reducir la hinchazón y la inflamación asociadas con la administración *in vivo* de la composición farmacéutica y el estrés fisiológico.

- 20 El portador será normalmente líquido, pero también puede ser sólido, o una combinación de componentes líquidos y sólidos. De manera deseable, el portador es portador fisiológicamente aceptable (por ejemplo, farmacéutica o farmacológicamente aceptable) (por ejemplo, excipiente o diluyente). Los portadores fisiológicamente aceptables se conocen bien y están fácilmente disponibles. La elección del portador se determinará, al menos en parte, por la ubicación del tejido y/o las células diana, y el método particular usado para administrar la composición.

- 25 Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como productos inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para usarse 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 y lioprotectores conocidos, 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 grado de que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe protegerse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclados de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxixelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

- 30 Las 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 clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

- 35 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado seco por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición de un excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase descrita anteriormente. Preferiblemente, el conjugado que contiene dominio de ligando peptídico descrito se formula para inyección (por ejemplo, administración parenteral). Con respecto a esto, de manera deseable la formulación es adecuada para administración intratumoral, pero también puede formularse

para inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, y similares.

Las formulaciones adecuadas para administración por inhalación incluyen formulaciones en aerosol. Las formulaciones en aerosol pueden colocarse en propelentes aceptables a presión, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También pueden formularse como preparaciones no a presión, para su administración a partir de un nebulizador o un atomizador.

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

Además, la composición descrita 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, tales como ibuprofeno o esteroides, pueden ser parte de la composición para reducir la hinchazón y la inflamación asociadas con la administración *in vivo* de la composición farmacéutica y el estrés fisiológico.

En el caso de terapia por inhalación, la composición farmacéutica de la presente invención está de manera deseable en forma de un aerosol. Están disponibles generadores de aerosoles y pulverizaciones para administrar el agente si está en forma sólida. Estos generadores proporcionan partículas que pueden respirarse o inhalarse, y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis dosificada predeterminada de un medicamento a una tasa adecuada para su administración a seres humanos. Los ejemplos de tales generadores de aerosoles y pulverizaciones incluyen insufladores e inhaladores de dosis medida conocidos en la técnica. Si están en forma líquida, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden convertirse en aerosol mediante cualquier dispositivo adecuado.

Cuando se usa en relación con administración intravenosa, intraperitoneal o intratumoral, la composición farmacéutica descrita puede comprender disoluciones, suspensiones o emulsiones del compuesto activo para inyección, estériles, acuosas y no acuosas, preparaciones que son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor pretendido. Estas preparaciones pueden contener uno o más de antioxidantes, tampones, tensioactivos, codisolventes, agentes bacteriostáticos, solutos que hacen que las composiciones sean isotónicas con la sangre del receptor pretendido, y otros componentes de formulación conocidos en la técnica. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados.

La divulgación también proporciona, si es deseable, realizaciones en las que los péptidos se administran como "terapias alternativas" y tales péptidos pueden conjugarse con polietilenglicol (PEG). La conjugación con PEG puede aumentar la semivida circulante de estos polipéptidos, reducir la inmunogenicidad y antigenicidad del polipéptido, y mejorar su bioactividad. Si se usa, puede usarse cualquier método adecuado de conjugación con PEG, incluyendo, pero sin limitarse a, hacer reaccionar metoxi-PEG con un(os) grupo(s) amino disponible(s) del péptido u otros sitios reactivos tales como, por ejemplo, histidinas o cisteínas. Además, pueden usarse enfoques de ADN recombinante para añadir aminoácidos con grupos reactivos con PEG al conjugado que contiene dominio de ligando peptídico. Además, pueden usarse estrategias de pegilación liberables e híbridas según los aspectos de la presente divulgación, tales como la pegilación de polipéptido, en la que las moléculas de PEG añadidas a determinados sitios de la molécula conjugada que contiene dominio de ligando peptídico se liberan *in vivo*. En la técnica se conocen ejemplos de métodos de conjugación con PEG. Véase, por ejemplo, Greenwald *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.* 55:217-250 (2003).

El animal puede ser cualquier paciente o sujeto que necesita tratamiento o diagnóstico. En realizaciones preferidas, el animal es un mamífero. En realizaciones particularmente preferidas, el animal es un ser humano. En otras realizaciones, el animal puede ser un ratón, rata, conejo, gato, perro, cerdo, oveja, caballo, vaca o un primate no humano.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, evidentemente, no deben interpretarse como que limitan su alcance de ninguna manera.

EJEMPLO 1

Este ejemplo describe el análisis de la capacidad de respuesta del paciente a Abraxane™, paclitaxel nanoparticulado unido a albúmina en vista del estado de SPARC del tumor retrospectivo.

Se trataron cincuenta y cuatro pacientes con cáncer de cabeza y cuello con Abraxane™, paclitaxel nanoparticulado unido a albúmina, intraarterial y se midieron sus tumores mediante radiografía para determinar la capacidad de respuesta al tratamiento. De manera retroactiva, se determinó el estado de SPARC del tumor para 16 pacientes para los cuales había datos disponibles.

Para todos los pacientes (n=54), la respuesta positiva global a Abraxane™, paclitaxel nanoparticulado unido a albúmina, fue de 45/54 (78%). Para pacientes con estado de SPARC del tumor conocido, 10 de 12 pacientes (83%) que tenían tumores positivos para SPARC presentaron respuesta a Abraxane™. En cambio, para pacientes que tenían tumores negativos para SPARC, sólo 1 de 4 pacientes (25%) presentó respuesta a tal tratamiento. Los resultados son significativos con P=0,06 usando la prueba exacta de Fisher.

Estos resultados muestran una correlación probable entre el estado positivo para SPARC del tumor y la capacidad de respuesta a quimioterapia con Abraxane™, paclitaxel nanoparticulado unido a albúmina.

EJEMPLO 2

Este ejemplo describe la identificación de los diferentes componentes de expresión de SPARC en el microentorno tumoral y su uso para proporcionar información de pronóstico.

Se evaluó una serie de anticuerpos frente a SPARC para determinar sus características de unión en una gama de tejidos normales y tumorales. Se determinó el patrón de expresión de SPARC, tal como se determinó mediante inmunotinción, en diversos componentes de tumores incluyendo los niveles de expresión de SPARC en células tumorales, vasos sanguíneos, fibroblastos, estroma, células inflamatorias y los tejidos normales adyacentes. Se identificaron dos anticuerpos con afinidad diferencial por SPARC y se emplearon en estudios de seguimiento. Específicamente, se determinó el patrón de tinción usando un anticuerpo monoclonal ("anticuerpo M") (anticuerpo monoclonal frente a SPARC (R&D Systems, Minneapolis, MN), n.º de catálogo MAB941, n.º de lote ECH045011 diluido 1:100 en un diluyente basado en tris) y un anticuerpo policlonal ("anticuerpo P") (anticuerpo policlonal frente a SPARC (R&D Systems, Minneapolis, MN), n.º de catálogo AF941, n.º de lote EWN04 diluido 1:50 en un diluyente basado en tris).

Se prepararon secciones histológicas de tumores en portaobjetos y se tiñeron usando un protocolo de inmunotinción convencional. En resumen, se prepararon matrices de núcleos de tejido de bloques de tumor fijados en formalina, incrustados en parafina (2 núcleos de las zonas más representativas por cada bloque) (Beecher Instruments, Silver Spring, Md) para crear una micromatriz tisular de núcleos que median 2,0 mm cada uno y se colocaron en portaobjetos con carga positiva. Entonces se colocaron los portaobjetos con muestras en un horno a 60°C durante 1 hora, se enfriaron, se desparafinizaron y se rehidrataron pasando por xilenos y disoluciones de etanol graduadas hasta agua. Se tiñeron todos los portaobjetos usando equipo de tinción automatizado (aparato de tinción automático Dako Cytomation, Dako, Carpintería, CA).

Se extinguieron todos los portaobjetos durante 5 minutos en una disolución de peróxido de hidrógeno al 3% en agua para bloquear la peroxidasa endógena. Tras un aclarado con tampón, se incubaron los portaobjetos con anticuerpo M o un reactivo de control negativo durante 30 minutos. Se incubó un kit de polímero de peroxidasa del rábano de ratón (Mouse MACH 3 HRP Polymer Kit, Biocare Medical, Concord, CA) durante 20 minutos por reactivo. Tras otro aclarado con tampón, se aplicó cromógeno DAB (Dako, Carpintería, CA) durante 10 minutos. Se usó hematoxilina para contrateñir los portaobjetos. Se usó el mismo protocolo para inmunoteñir muestras con anticuerpo P, aunque se usó un kit de detección de avidina-biotina (Biocare Medical, Concord, CA), incubado durante 15 minutos por reactivo, en lugar del kit de detección de HRP.

Se realizó una evaluación patológica detallada de la expresión de SPARC en una serie de tumores mediante un patólogo certificado por la junta. Se puntuó el nivel de expresión de SPARC, tal como se determinó mediante inmunohistoquímica, para diferentes componentes tumorales. Se asignaron puntuaciones al nivel de expresión de SPARC en una escala de 0-3, siendo 3 la puntuación más positiva, tal como se realiza comúnmente en la técnica y conocen bien los expertos habituales en la técnica. Los anticuerpos monoclonales y policlonales usados detectaron diferentes patrones de expresión de SPARC tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

	Tumor			Fibroblastos		
	Anticuerpo P	Anticuerpo M		Anticuerpo P	Anticuerpo M	
Mama	30/106	35/106	p = ns	82/107	26/107	p < 0,0001
Páncreas	20/36	7/36	p = 0,0031	18/29	5/29	p = 0,0011
Melanoma	30/41	20/41	p = 0,0408	19/33	14/33	p = ns

El anticuerpo policlonal demostró tinción preferente de SPARC en fibroblastos. Mientras tanto, el anticuerpo monoclonal tiñó preferiblemente SPARC en células tumorales. A partir de estas preferencias de tinción, se analizaron los siguientes patrones de SPARC para determinar su valor predictivo en una serie de tumores:

- A, cuando se encontró +3 en cualquiera de los componentes.
- B, cuando se encontró +3 en cualquiera de los componentes con el anticuerpo monoclonal anti-SPARC.
- C, cuando se encontró +3 en cualquiera de los componentes con el anticuerpo monoclonal anti-SPARC.

D, cuando se encontró +3 en células tumorales con ambos anticuerpos anti-SPARC.

E, cuando se encontró +3 en fibroblastos con ambos anticuerpos anti-SPARC.

Se usaron regresión logística y riesgos proporcionales para determinar la correlación entre la respuesta, supervivencia libre de progresión ("PFS") y supervivencia global ("OS") y el patrón de SPARC.

- 5 Uno de los conjuntos de tumores fue un ensayo de fase II de carboplatino y nab-paclitaxel (ABI-007) en pacientes con melanoma en estadio IV no resecable. Específicamente, se administraron nab-paclitaxel (100 mg/m²) y carboplatino (AUC2) en los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días. Tal como se muestra en la figura 1, hubo una correlación estadísticamente significativa entre el patrón D (es decir, cuando se encontró +3 en células tumorales con ambos anticuerpos anti-SPARC) y la supervivencia global.
- 10 Otro conjunto de tumores se obtuvo de pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado que se habían tratado con Abraxane™, paclitaxel nanoparticulado unido a albúmina (100-150 mg/m²) y gencitabina (1000 mg/m²) administrados en los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días. Entre estos pacientes, se observaron las respuestas al tratamiento mostradas en la tabla 2.

Tabla 2

Respuesta	CR*	PR*	SD*	PD*
N de 32 pacientes	2 (6%)	14 (44%)	14 (44%)	2 (6%)

- 15 (*CR, respuesta completa; PR, respuesta parcial; SD, enfermedad estable; PD, enfermedad progresiva)

Entre estos pacientes había una correlación significativa entre la respuesta y la expresión de SPARC en células tumorales tal como se determina mediante tinción con el anticuerpo policlonal anti-SPARC (prueba de la t unilateral, p = 0,027). Por otro lado, la tinción de las células tumorales con el anticuerpo monoclonal predijo una peor supervivencia global y supervivencia libre de progresión.

- 20 Además, la tinción con patrón B (es decir, cuando se encontró +3 en cualquiera de los componentes con el anticuerpo monoclonal anti-SPARC) fue predictiva de la peor supervivencia libre de progresión en este régimen en estos pacientes con adenocarcinoma de páncreas.

- 25 Estos resultados muestran una relación estadísticamente significativa entre respuestas del paciente a regímenes basados en paclitaxel nanoparticulado (específicamente, regímenes basados en Abraxane®) y el patrón de expresión de SPARC en los diferentes tipos de células del tumor.

EJEMPLO 3

Este ejemplo evalúa si la expresión de SPARC tiene cualquier correlación con el estado positivo para receptor de estrógenos (ER) en cáncer de mama.

- 30 Se evaluaron cincuenta y cuatro muestras de tumor de mama positivas para ER (ER+) y 52 negativas para ER (ER-) de dos ensayos de mama con terapia neoadyuvante con la combinación de dos anticuerpos anti-SPARC. La tinción de las células tumorales con el anticuerpo monoclonal anti-SPARC se correlacionó significativamente con el estado positivo para ER (p=0,01). De los 54 tumores ER+, el 44,44% (n=24) fueron positivos para SPARC con mAT, mientras que el 55,58% (n=30) fueron negativos para SPARC. De los 52 tumores ER-, el 78,5% (n=41) también fueron negativos para SPARC, mientras que el 21,15% (n= 11) fueron positivos para SPARC.

- 35 Aunque se piensa que el estado positivo para ER es un buen indicador de pronóstico en cáncer de mama, estos resultados demuestran también está asociado con el estado positivo de SPARC.

EJEMPLO 4

Este ejemplo proporciona un protocolo a modo de ejemplo para la preparación y tinción inmunológica de secciones histológicas.

- 40 Se preparan matrices de núcleos de tejido de bloques de tumor fijados en formalina, incrustados en parafina (2 núcleos de las zonas más representativas por cada bloque) (Beecher Instruments, Silver Spring, Md) para crear una micromatriz tisular de núcleos que medían 2,0 mm cada uno y se colocan en portaobjetos con carga positiva. Se colocan portaobjetos con muestras en un horno a 60°C durante 1 hora, se enfrían, se desparafinizan y se rehidratan pasando por xilenos y disoluciones de etanol graduadas hasta agua. Se extinguen todos los portaobjetos durante 5 minutos en una disolución de peróxido de hidrógeno al 3% en agua para bloquear la peroxidasa endógena. Se realiza la recuperación de antígeno mediante un método térmico en el que se colocan las muestras en una disolución de ácido cítrico, pH 6,1 (código S1699, Dako, Carpintería, CA) durante 20 minutos a 94°C usando un aparato de cocción de verduras al vapor, después se enfrían durante 15 minutos. Entonces se colocan los portaobjetos en un sistema de inmunotinción tal como el aparato de tinción automático Dako Cytomation (Dako,

Carpinteria, CA) para su uso con inmunohistoquímica usando anticuerpos adecuados.

Este método se basa en la aplicación consecutiva de (1) un anticuerpo primario frente al antígeno que va a localizarse, (2) anticuerpo de unión biotinilado, (3) estreptavidina conjugada a enzima y (4) cromógeno de sustrato (DAB). Entonces se contratiñen los portaobjetos en hematoxilina de Richard-Allan (Kalamazoo, MI), se deshidratan a través de disoluciones de etanol graduadas y se cubren con un cubreobjetos.

EJEMPLO 5

Este ejemplo proporciona un protocolo a modo de ejemplo para la preparación y tinción inmunológica de secciones histológicas usando inmunotinciones múltiples simultáneamente ("inmunotinción doble de 2 colores").

Como en el ejemplo 4 anterior, se cortan bloques de tejido incrustados en parafina a 4 μm y se colocan en portaobjetos con carga positiva. Entonces se colocan portaobjetos con muestras en un horno a 60°C durante 1 hora, se enfrían, se desparafinizan y se rehidratan pasando por xilenos y disoluciones de etanol graduadas hasta agua. Entonces se extinguen todos los portaobjetos durante 5 en una disolución de peróxido de hidrógeno al 3% en agua para bloquear la peroxidasa endógena. Se realiza la recuperación de antígeno mediante un método térmico en el que se colocan las muestras en una disolución de ácido cítrico (pH 6,1) durante 25 minutos (en comparación con 20 minutos para los anticuerpos individuales mencionados anteriormente) a 94°C y se enfrían durante 15 minutos usando un aparato de cocción de verduras al vapor. Entonces se colocan los portaobjetos en un sistema de inmunotinción (Dako, Carpinteria, CA) para su uso con inmunohistoquímica.

Se incuba el primer anticuerpo primario durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incuba el sistema de detección, unión doble EnVision+ (Dako, código K4061, Carpinteria, CA), durante 30 minutos. Por último, cromógeno DAB. Antes de aplicar el segundo anticuerpo primario, se añade bloque de proteína libre de suero (Dako, código X0909, Carpinteria, CA) para minimizar el fondo y el cruce entre anticuerpos primarios. Se incuba el segundo anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Se usa de nuevo la unión doble EnVision+ (Dako, código K4061, Carpinteria, CA) como sistema de detección y se incuba durante 30 minutos. Se usa NovaRED (Vector Laboratories, Burlingame, Calif) con el segundo anticuerpo primario de modo que puede diferenciarse fácilmente la tinción por los dos anticuerpos. Entonces se contratiñen los portaobjetos en hematoxilina de Richard-Allan, se deshidratan a través de disoluciones de etanol graduadas, y se cubren con un cubreobjetos.

Debe interpretarse que el uso de los términos "un/o" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o quede claramente contradicho 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 limita a") a menos que se indique lo contrario. Se pretende que la mención de intervalos de valores en el presente documento sirva simplemente como método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor por separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor por separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o quede claramente contradicho de otro modo por el contexto. Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos, o términos a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como"), proporcionados en el presente documento, simplemente ilustre mejor la invención y no plantean una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún término en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que ningún elemento no reivindicado es esencial en la práctica de la invención.

En el presente documento se describen realizaciones preferidas de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Variaciones de estas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para los expertos habituales en la técnica tras leer la descripción anterior.

45

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir la respuesta de un tumor en un animal a un régimen quimioterápico, que comprende:
 - (a) aplicar un primer anticuerpo anti-SPARC a una sección histológica del tumor, en el que el primer anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en células tumorales;
 - 5 (b) aplicar un segundo anticuerpo anti-SPARC a la sección histológica de (a) o una segunda sección histológica del tumor, en el que el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en fibroblastos; y
 - (c) predecir una respuesta positiva al régimen quimioterápico si el primer anticuerpo anti-SPARC y el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñen la sección o secciones histológicas.
- 10 2. Método para predecir la respuesta de un tumor en un animal a un régimen quimioterápico, que comprende:
 - (a) aplicar un primer anticuerpo anti-SPARC a una sección histológica del tumor, en el que el primer anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en células tumorales;
 - (b) aplicar un segundo anticuerpo anti-SPARC a la sección histológica de (a) o una segunda sección histológica del tumor, en el que el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe de manera preferente SPARC en fibroblastos; y
 - 15 (c) predecir una respuesta positiva al régimen quimioterápico si el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe la sección o secciones histológicas.
3. Método para predecir la respuesta de un tumor en un animal a un régimen quimioterápico, que comprende:
 - (a) aplicar un primer anticuerpo anti-SPARC a una sección histológica del tumor, en el que el primer anticuerpo anti-SPARC reconoce un epítipo de SPARC reconocido por el anticuerpo monoclonal MAB941;
 - 20 (b) aplicar un segundo anticuerpo anti-SPARC a la sección histológica de (a) o una segunda sección histológica del tumor, en el que el segundo anticuerpo reconoce un epítipo de SPARC reconocido por el anticuerpo policlonal AF941; y
 - (c) predecir una respuesta positiva al régimen quimioterápico si el primer anticuerpo anti-SPARC y el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñen la sección o secciones histológicas; o
 - 25 (d) aplicar un primer anticuerpo anti-SPARC a una sección histológica del tumor, en el que el primer anticuerpo anti-SPARC reconoce un epítipo de SPARC reconocido por el anticuerpo monoclonal MAB941;
 - (e) aplicar un segundo anticuerpo anti-SPARC a la sección histológica de (a) o una segunda sección histológica del tumor, en el que el segundo anticuerpo reconoce un epítipo de SPARC inmunodominante reconocido por el anticuerpo policlonal AF941; y
 - 30 (f) predecir una respuesta positiva al régimen quimioterápico si el segundo anticuerpo anti-SPARC inmunotiñe la sección o secciones histológicas.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el tumor se selecciona del grupo que consiste en tumores de la cavidad oral, tumores faríngeos, tumores del sistema digestivo, tumores del sistema respiratorio, tumores óseos, tumores cartilaginosos, metástasis óseas, sarcomas, tumores de piel, melanoma, tumores de mama, tumores del aparato genital, tumores de las vías urinarias, tumores orbitales, tumores del cerebro y el sistema nervioso central, gliomas, tumores del sistema endocrino, tumores de tiroides, tumores de esófago, tumores gástricos, tumores del intestino delgado, tumores de colon, tumores rectales, tumores anales, tumores de hígado, tumores de vesícula biliar, tumores de páncreas, tumores de laringe, tumores del pulmón, tumores bronquiales, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de pulmón de células pequeñas, tumores de cuello uterino, tumores de cuerpo uterino, tumores de ovarios, tumores de vulva, tumores de vagina, tumores de próstata, carcinoma de próstata, tumores de testículos, tumores del pene, tumores de vejiga urinaria, tumores del riñón, tumores de la pelvis renal, tumores de la uretra, tumores de cabeza y cuello, cáncer de paratiroides, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica y tumores anales.
- 35 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el régimen quimioterápico comprende la administración de uno o más de mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina), clorambucilo, etilniminas, metilmelaminas, hexametilmelamina, tiotepa, busulfano, carmustina (BCNU), semustina (metil-CCNU), lomustina (CCNU), estreptozocina (estreptozotocina), fosfato de estramustina, dacarbazina (DTIC, dimetil-triazenoimidazolcarboxamida), temozolomida, metotrexato (ametofterina), fluorouracilo (5-fluorouracilo, 5-FU, 5FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina, FUdR), citarabina (arabinósido de
- 50

- 5
10
- citosina), gemcitabina, mercaptopurina (6-mercaptopurina, 6-MP), tioguanina (6-tioguanina, TG), pentostatina (2'-desoxicoformicina, desoxicoformicina), cladribina, fludarabina, amsacrina, vinblastina (VLB), vincristina, paclitaxel, docetaxel (Taxotere); epipodofilotoxina, etopósido, tenipósido, camptotecinas, topotecán, irinotecán, dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina, rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, mitomicina (mitomicina C), idarubicina, epirubicina, L-asparaginasa, interferón alfa, interleucina 2, buserelina, adrenocorticosteroides, prednisona, progestinas, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol; estrógenos, dietilestilbestrol, etinil-estradiol, tamoxifeno, anastrozol, propionato de testosterona, fluoximesterona, flutamida, bicalutamida, leuprolida, talidomida, cisplatino (cis-DDP), oxaliplatino, carboplatino, antracenedionas, mitoxantrona, hidroxiurea; metilhidrazina, procarbazona (N-metilhidrazina, MIH), mitotano (o,p'-DDD), aminoglutetimida, bezaroteno; inhibidores de tirosina cinasas, imatinib o agentes antiangiogénicos.
- 15
6. Método o régimen quimioterápico para su uso según la reivindicación 5, en el que el régimen terapéutico comprende además terapias alternativas; preferiblemente el régimen terapéutico comprende además administrar toxinas, lectinas, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosinas cinasas receptoras, gefitinib, erlotinib, cetuximab, mesilato de imatinib, inhibidores del proteosoma, bortezomib, inhibidores de VEGFR2, PTK787, inhibidores de aurora cinasas, ZM447439; inhibidores de mTOR, inhibidores de ciclooxigenasa-2, rapamicina, sirolimús, Rapamune™, inhibidores de la farnesiltransferasa, tipifarnib, Zarnestra, inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz, BAY 12-9566; polisacárido sulfatado tecogalán, inhibidores de la angiogénesis, bevacizumab, análogos de fumagilina, TNP-4, carboxiaminotriazol, BB-94, BB-2516,
- 20
- talidomida, interleucina-12; linomida, anticuerpos frente a factores de crecimiento vasculares, anticuerpos frente a receptores de factores de crecimiento vasculares, inhibidores de receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas, inhibidores de proteína cinasa C, inhibidores de cinasas activadas por mitógenos, inhibidores de proteínas cinasas cinasas activadas por mitógenos, inhibidores del oncogén transformante del virus del sarcoma de Rous (SRC), inhibidores de la histonadesacetilasa, inhibidores de factores inducibles por hipoxia pequeños, inhibidores de hedgehog e inhibidores de señalización de TGF-!3 o combinaciones de los mismos.
- 25
7. Método según la reivindicación 1, en el que el tumor es un melanoma y el régimen quimioterápico comprende paclitaxel unido a albúmina nanoparticulado y carboplatino.
- 30
8. Método según la reivindicación 2, 3 d-f, en el que el tumor es un carcinoma de páncreas y el régimen quimioterápico comprende paclitaxel unido a albúmina nanoparticulado.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a-c, o régimen quimioterápico para su uso según las reivindicaciones 4-8, en el que el primer anticuerpo anti-SPARC es un anticuerpo monoclonal o en el que el segundo anticuerpo anti-SPARC es un anticuerpo policlonal.
- 35
10. Método o régimen quimioterápico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la tinción con el primer anticuerpo anti-SPARC y el segundo anticuerpo anti-SPARC se realiza (i) simultáneamente en la misma sección histológica del tumor o (ii) por separado en secciones histológicas diferentes del tumor.
- 40
11. Método o régimen quimioterápico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a-c o 4-8, en el que el primer anticuerpo anti-SPARC es el anticuerpo monoclonal MAB941 o en el que el segundo anticuerpo anti-SPARC es el anticuerpo policlonal AF941.
12. Método o régimen quimioterápico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el animal es un paciente humano.

FIG. 1
Correlación entre OS y estado positivo de SPARC

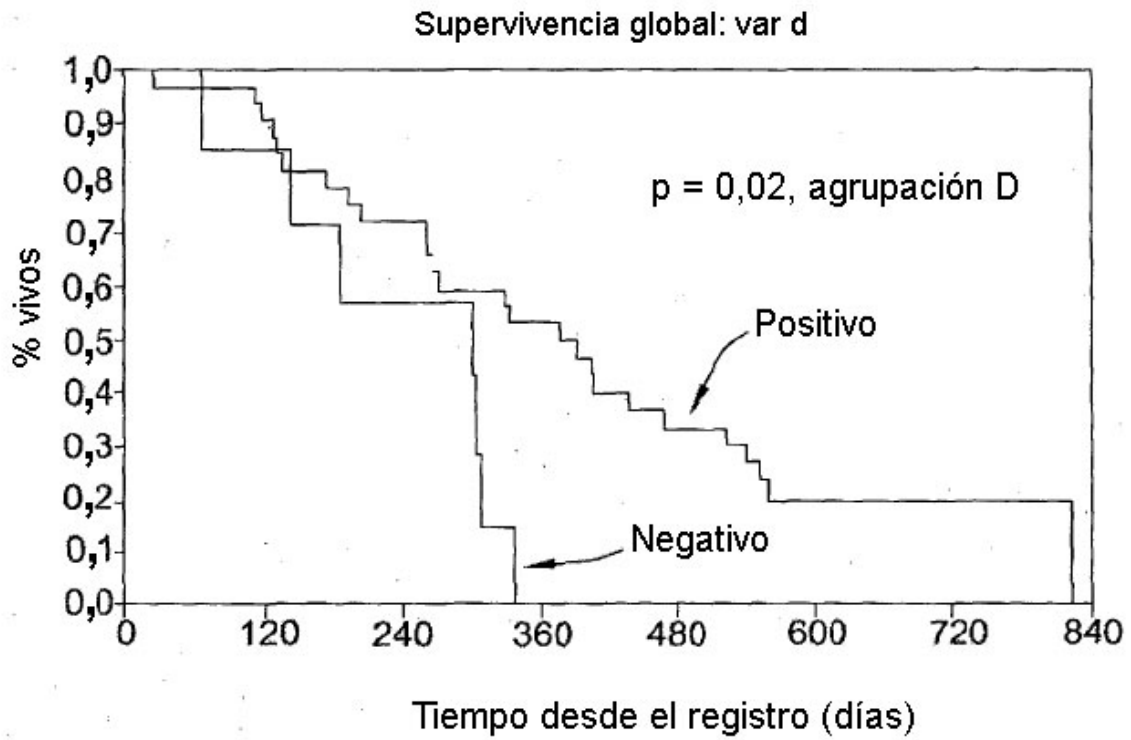


FIG. 2

La mAb-T y agrupación B predijeron la peor PFS

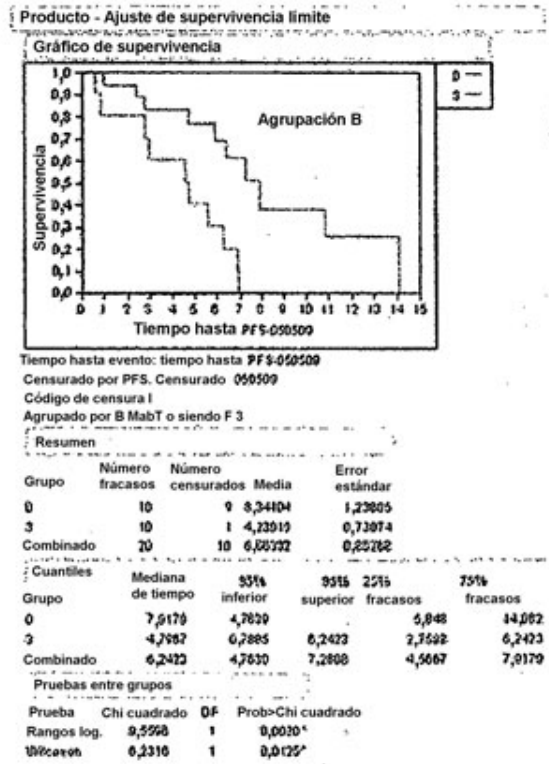
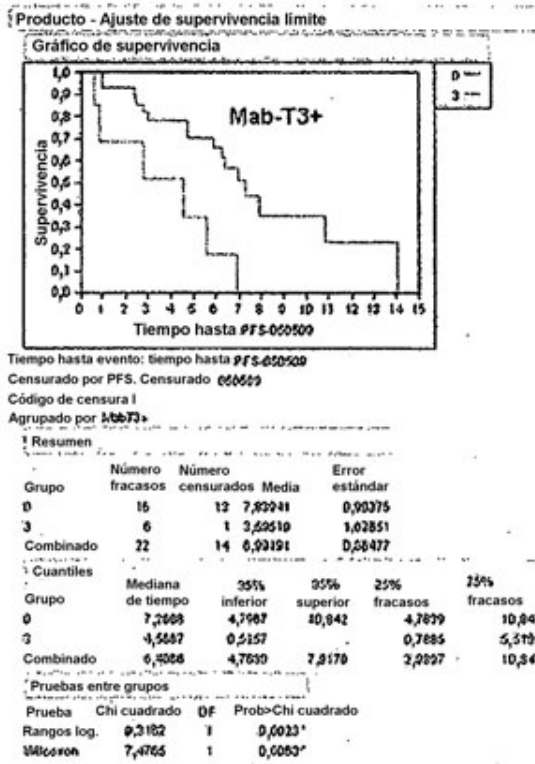
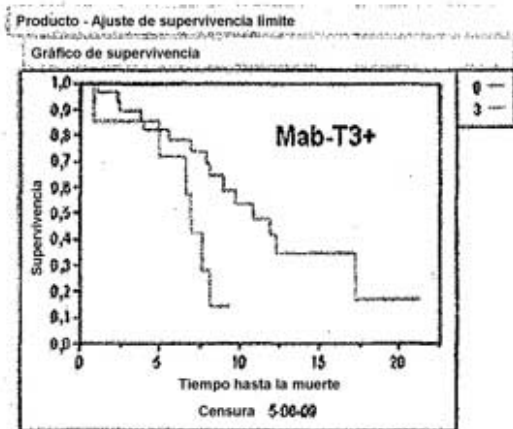


FIG. 3

La mAb-T predijo la peor OS



Tiempo hasta evento: tiempo hasta la muerte | censura 5-08-09

Censurado por supervivencia. Censurado 050509

Código de censura 1

Agrupado por MabT3+

Resumen

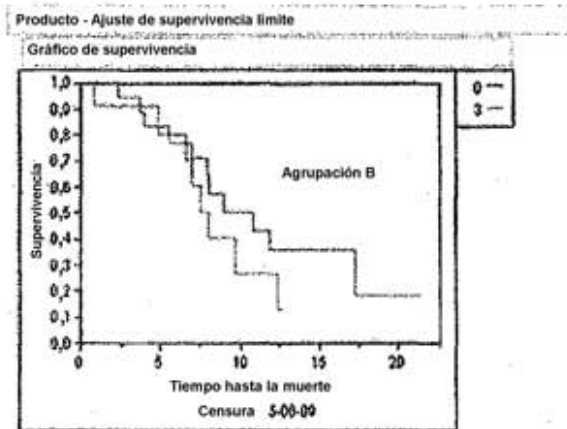
Grupo	Número fracasos	Número censurados	Media	Sesgado	Error estándar
0	16	14	10,9775	Sesgado	1,10923
3	6	1	8,12943	Sesgado	0,88485
Combinado	21	15	10,0903	Sesgado	1,01945

Cuantiles

Grupo	Mediana de tiempo	95% inferior	95% superior	25% fracasos	75% fracasos
0	10,875	7,017	17,28	6,032	17,28
3	8,069	0,788	8,092	4,928	8,092
Combinado	8,969	8,032	12,287	6,571	17,38

Pruebas entre grupos

Prueba	Chi cuadrado	DF	Prob>Chi cuadrado
Rangos log.	6,0375	1	0,0241*
Wilcoxon	3,5559	1	0,0594



Tiempo hasta evento: tiempo hasta la muerte | censura 5-08-09

Censurado por supervivencia. Censurado 050509

Código de censura 1

Agrupado por B MabT o siendo F 3

Resumen

Grupo	Número fracasos	Número censurados	Media	Sesgado	Error estándar
0	11	8	10,0398	Sesgado	1,39482
3	8	3	8,12901	Sesgado	1,12805
Combinado	19	11	10,1221	Sesgado	1,04001

Cuantiles

Grupo	Mediana de tiempo	95% inferior	95% superior	25% fracasos	75% fracasos
0	10,875	6,032	-	6,032	17,28
3	8,062	4,028	12,287	6,571	12,287
Combinado	8,969	8,032	12,287	6,571	17,28

Pruebas entre grupos

Prueba	Chi cuadrado	DF	Prob>Chi cuadrado
Rangos log.	0,9102	1	0,3401
Wilcoxon	0,4838	1	0,4887