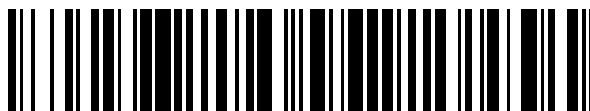


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 848**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/39** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2005 E 14163409 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2784082**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de suministro en el sitio de enfermedad que comprenden paclitaxel**

30 Prioridad:

**14.05.2004 US 571622 P**

**18.02.2005 US 654261 P**

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

**10.04.2018**

73 Titular/es:

**ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC (100.0%)**

**11755 Wilshire Boulevard**

**Los Angeles, CA 90025, US**

72 Inventor/es:

**TRIEU, VUONG;**

**DESAI, NEIL P. y**

**SOON-SHIONG, PATRICK**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 662 848 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 farmacéuticas de suministro en el sitio de enfermedad que comprenden paclitaxel

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a métodos para tratar el cáncer; así como otras enfermedades que implican la actividad anómala, proliferativa, hiperplásica y remodelante, inflamatoria en tejidos y órganos. La invención se refiere además a métodos para el direccionamiento, la obtención de imágenes y la determinación de la respuesta de tumores de mamíferos a un agente quimioterápico usando ligandos adecuados que reconocen proteínas de unión a albúmina.

**Antecedentes de la invención**

10 Se ha mostrado que las formulaciones de nanopartículas de albúmina reducen la toxicidad de agentes terapéuticos escasamente solubles. Por ejemplo, la patente estadounidense 6.537.579 da a conocer una formulación de paclitaxel con nanopartículas de albúmina que está libre de emulsionantes tóxicos.

15 El agente anticancerígeno paclitaxel, comercializado por Bristol Myers Squibb con la marca comercial Taxol<sup>®</sup>, está aprobado actualmente para el tratamiento de varios cánceres incluyendo cáncer de ovario, de pulmón y de mama. La limitación principal del uso de paclitaxel es su escasa solubilidad. Por consiguiente, la formulación de Taxol<sup>®</sup> contiene Cremophor<sup>®</sup> EL como el vehículo de solubilización, pero la presencia de Cremophor<sup>®</sup> en esta formulación se ha vinculado con graves reacciones de hipersensibilidad en animales (Lorenz *et al.*, Agents Actions 7, 63-67, 1987) y seres humanos (Weiss *et al.*, J. Clin. Oncol. 8, 1263-1268, 1990). Por consiguiente, los pacientes que reciben Taxol<sup>®</sup> requieren medicación previa con corticosteroides (dexametasona) y antihistamínicos para reducir la hipersensibilidad y anafilaxia que se producen debido a la presencia de Cremophor<sup>®</sup>.

20 En cambio, Abraxane<sup>®</sup> también conocido como ABI-007 es una formulación de paclitaxel con nanopartículas de albúmina, libre de Cremophor<sup>®</sup>, comercializada por Abraxis Oncology. El uso de una nanopartícula 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<sup>®</sup> se caracteriza por reacciones de hipersensibilidad reducidas en comparación con Taxol<sup>®</sup>. Por consiguiente, no se requiere medicación previa para pacientes que reciben Abraxane<sup>®</sup>.

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

30 Se sabe que las nanopartículas coloidales o las partículas de tamaño < 200 nm tienden a concentrarse en el sitio del tumor debido a vasculaturas con fugas. Este efecto se ha descrito para varias formulaciones liposomales (Papahadjopoulos, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 11460, 1991); (Gabizon, A., Cancer Res., 52, 891, 1992); (Dvorak, *et al.*, Am. J. Pathol. 133, 95, 1988); (Dunn, *et al.*, Pharm. Res., 11, 1016-1022, 1994) y (Gref, *et al.*, Science 263, 1600-1603, 1994). Es posible que nanopartículas de paclitaxel localizadas en el sitio del tumor puedan dar como resultado la liberación retardada del fármaco en el sitio del tumor dando como resultado una mayor eficacia en comparación con la administración del fármaco en su forma solubilizada (que contiene Cremophor<sup>®</sup>).

35 Tales formulaciones de nanopartículas comprenden al menos aproximadamente el 50% del agente activo en forma de nanopartícula. Además, tales formulaciones de nanopartículas comprenden al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 90% del agente activo en forma de nanopartícula. Además, tales formulaciones de nanopartículas comprenden al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 98% del agente activo en forma de nanopartícula.

40 La proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC), también conocida como osteonectina, es una proteína de 281 aminoácidos. SPARC tiene afinidad por una amplia variedad de ligandos incluyendo cationes (por ejemplo, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</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 trombospodina 1), células endoteliales, plaquetas, albúmina e hidroxiapatita. La expresión de SPARC está regulada con respecto al desarrollo, y se expresa predominantemente en tejidos que experimentan remodelación durante el desarrollo normal o en respuesta a lesión (véase, por ejemplo, Lane *et al.*, FASEB J., 8, 163-173 (1994)). Se expresan altos niveles de proteína SPARC en huesos y dientes en desarrollo.

45 SPARC es una proteína matricelular regulada por incremento en varios cánceres agresivos, pero que está ausente en tejidos normales (Porter *et al.*, J. Histochem. Cytochem., 43, 791(1995)). En efecto, la expresión de SPARC se induce en una variedad de tumores (por ejemplo, de vejiga, hígado, ovario, riñón, intestino y mama). Por ejemplo, en el cáncer de vejiga, la expresión de SPARC se ha asociado con carcinoma avanzado. Se ha mostrado que los tumores de vejiga invasivos de estadio T2 o superior expresan mayores niveles de SPARC a los de tumores de

vejiga de estadio T1 (o tumores menos superficiales), y tienen un mal pronóstico (véase, por ejemplo, Yamanaka *et al.*, J. Urology, 166, 2495-2499 (2001)). En meningiomas, la expresión de SPARC se ha asociado sólo con tumores invasivos (véase, por ejemplo, Rempel *et al.*, Clinical Cancer Res., 5, 237-241 (1999)). La expresión de SPARC también se ha detectado 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)). La expresión de SPARC también se ha asociado 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 la metástasis de mama por el hueso. También se sabe que SPARC se une a albúmina (véase, por ejemplo, Schnitzer, J Biol. Chem., 269, 6072 (1994)).

La terapia con anticuerpos es un método eficaz para controlar una enfermedad en la que puede identificarse un marcador proteico específico. Los ejemplos incluyen Avastin, un anticuerpo anti-VEGF, Rituxan, un anticuerpo anti-CD20 y Remicade, un anticuerpo anti-TNF. Como tal, un anticuerpo contra SPARC representaría un agente terapéutico importante para tratar tumores humanos y de otros mamíferos, así como otros trastornos proliferativos, hiperplásicos, remodelantes e inflamatorios que expresan la proteína SPARC. Adicionalmente, un anticuerpo contra SPARC conjugado con un medio de contraste o de obtención de imágenes sería un medio para detectar y diagnosticar tales trastornos.

Sigue existiendo la necesidad de un método para tratar tumores humanos y de otros mamíferos, así como otros trastornos proliferativos, hiperplásicos, remodelantes e inflamatorios. Además, sigue existiendo la necesidad de determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero para evaluar la eficacia del agente quimioterápico. Adicionalmente, se necesitan medios adecuados para detectar y diagnosticar tales trastornos. Estas y otras ventajas de la invención, así como características inventivas adicionales, resultarán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

#### Breve resumen de la invención

La invención se refiere a las siguientes realizaciones definidas en los siguientes puntos 1 a 7:

1. Una composición farmacéutica que comprende paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC, en la que dicho anticuerpo se une específicamente a SPARC/osteonectina que es una glicoproteína de 38 kD, y un portador farmacéuticamente aceptable.
2. El uso de paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC que se une específicamente a SPARC/osteonectina que es una glicoproteína de osteonectina de 38 kD, en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer en un mamífero.
3. Un paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC que se une específicamente a SPARC/osteonectina, que es una glicoproteína de osteonectina de 38 kD, para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero.
4. El uso según el punto 2 o el paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC para su uso según el punto 3, en el que el anticuerpo es monoclonal.
5. El uso o el paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC para su uso según el punto 4, en el que el anticuerpo es humanizado.
6. La composición farmacéutica según el punto 1, en la que el anticuerpo es monoclonal.
7. La composición farmacéutica según el punto 6, en la que el anticuerpo es humanizado.

En el presente documento se da a conocer un método para determinar la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterápico, en el que el método comprende las etapas de (a) aislar una muestra biológica del mamífero, (b) detectar la expresión de la proteína SPARC en la muestra biológica y (c) cuantificar la cantidad de proteína SPARC en la muestra biológica. La invención proporciona además un método para usar la proteína de unión a albúmina como agente terapéutico, para usar SPARC y anticuerpos contra SPARC o proteínas de unión a SPARC como agentes terapéuticos, para suministrar un agente quimioterápico a un sitio de enfermedad en un mamífero, en el que el método comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende el agente quimioterápico acoplado a un compuesto que puede unirse a una proteína de unión a albúmina y un portador farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, la invención proporciona una composición que comprende un agente quimioterápico acoplado a un compuesto que puede unirse a una proteína SPARC y un portador farmacéuticamente aceptable. Además, se da a conocer en el presente documento un agente de suministro que comprende un grupo de reconocimiento de SPARC y un agente terapéutico, en el que el agente terapéutico se acopla al grupo de reconocimiento de SPARC. Además, se da a conocer en el presente documento un método para suministrar un agente quimioterápico a un tumor en un mamífero, en el que el método comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende un agente quimioterápico acoplado a

una proteína SPARC que puede unirse a albúmina y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la invención pueden ser una molécula pequeña, molécula grande o proteínas.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la tinción de albúmina y SPARC en xenoinjertos de tumor MX-1.

5 La figura 2 ilustra la transcitosis de paclitaxel a través de monocapas de células endoteliales.

### Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto ahora que existe un mecanismo de localización adicional para composiciones que comprenden proteínas de unión a albúmina. Las proteínas de unión a albúmina, tales como SPARC, cubilina y TGF $\beta$ , pueden usarse para dirigir un agente terapéutico hasta un sitio de enfermedad caracterizado por una sobreexpresión de una proteína de unión a albúmina.

Se da a conocer en el presente documento el uso de un grupo, acoplado a un agente, en el que el grupo puede unirse a una proteína de unión a albúmina, tal como SPARC, cubilina o TGF $\beta$ , y el agente es un agente terapéutico, de obtención de imágenes o de suministro para enfermedades en las que la proteína de unión a albúmina desempeña un papel predominante y se sobreexpresa en relación con tejidos normales. Preferiblemente, la proteína de unión a albúmina se selecciona de SPARC, cubilina o TGF $\beta$ . Lo más preferiblemente, la proteína de unión a albúmina es una SPARC y el grupo que se une a la proteína de unión a albúmina es un grupo de reconocimiento de SPARC. Los grupos de reconocimiento de SPARC adecuados incluyen, pero no se limitan a ligandos, moléculas pequeñas, anticuerpos.

Se da a conocer en el presente documento un método para determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero a un agente quimioterápico. El método comprende (a) aislar una muestra biológica del ser humano, (b) detectar la expresión de la proteína SPARC en la muestra biológica y (c) cuantificar la cantidad de proteína SPARC en la muestra biológica. Una vez que se determina la cantidad de SPARC expresada por el tumor, puede establecerse la eficacia del agente quimioterápico mediante, por ejemplo, la correlación de la expresión de SPARC con la dosificación de agente terapéutico administrado. Se da a conocer además en el presente documento el uso de anticuerpo producido contra SPARC como agente terapéutico, o un agente de obtención de imágenes para enfermedades en las que SPARC desempeña un papel predominante y se sobreexpresa con relación a tejidos normales.

A continuación en el presente documento, por simplicidad, todas las proteínas, incluyendo SPARC, que se unen a albúmina se denominan SPARC. La proteína SPARC es responsable de la acumulación de albúmina en ciertos tumores humanos. Como la albúmina es el principal transportador de fármacos quimioterápicos, el nivel de expresión de SPARC es indicativo de la cantidad de fármaco quimioterápico que penetra y se retiene por el tumor. Por tanto, el nivel de expresión de SPARC es predictivo de la capacidad de respuesta del tumor a la quimioterapia.

Cualquier muestra biológica adecuada puede aislarse del mamífero de interés en el contexto del método inventivo. Preferiblemente, la muestra biológica se aísla del tumor, tal como mediante una biopsia del tumor. Alternativamente, la muestra biológica puede aislarse de un líquido corporal del mamífero, incluyendo, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero u orina. Las técnicas y los métodos para el aislamiento de muestras biológicas se conocen por los expertos en la técnica.

Cualquier agente farmacéuticamente activo adecuado puede usarse en el método inventivo (por ejemplo, un agente quimioterápico acoplado a un grupo de reconocimiento de SPARC), siempre que el transporte o la unión del agente activo requiera de albúmina. Los agentes activos adecuados incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la tirosina cinasa (genisteína), agentes biológicamente activos (TNF o TTF), radionúclidos (por ejemplo,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{32}\text{P}$  y otros radionúclidos terapéuticos conocidos), adriamicina, antibióticos de ansamicina, asparaginasa, bleomicina, busulfano, cisplatino, carboplatino, carmustina, capecitabina, clorambucilo, citarabina, ciclofosfamida, camptotecina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, etopósido, epotilonas, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiaurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, mercaptopurina, melfalán, metotrexato, rapamicina (sirolímús) y derivados, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nitrosourea, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, estreptozocina, tenipósido, tioguanina, tiotepa, taxanos, vinblastina, vincristina, vinorelbina, taxanos, combretastatinas, discodermolidas, transplatino, agentes de direccionamiento vascular, compuestos anti-factor de crecimiento endotelial vascular ("anti-VEGF"), compuestos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico ("anti-EGFR"), 5-fluorouracilo, y derivados de los mismos.

Adicionalmente, el agente farmacéuticamente activo puede ser toxinas tales como ricina A, radionúclidos, el fragmento Fc del propio anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, diacuerpos, y similares. Los agentes farmacéuticamente activos seleccionados pueden reconocer ellos mismos y unirse a SPARC o se unen adecuadamente a un grupo de reconocimiento de SPARC que reconoce SPARC, incluyendo, por ejemplo, un agente proteico o no proteico, un anticuerpo, fragmento Fc del propio anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, diacuerpos, péptidos u otras moléculas pequeñas no proteicas.

Una o más dosis de uno o más agentes quimioterápicos pueden administrarse según el método inventivo. El tipo y número de agentes quimioterápicos usados en el método inventivo dependerán del régimen quimioterápico convencional para un tipo de tumor particular. En otras palabras, aunque un cáncer particular puede tratarse de manera rutinaria con un único agente quimioterápico, otro puede tratarse de manera rutinaria con una combinación de agentes quimioterápicos. Los métodos para el acoplamiento o la conjugación de agentes terapéuticos, quimioterápicos, radionúclidos, etc. adecuados con anticuerpos o fragmentos de los mismos están bien descritos en la técnica.

Las enfermedades para las que la presente invención es útil incluyen estados anómalos de proliferación, remodelación tisular, hiperplasia, cicatrización de heridas exagerada en cualquier tejido corporal incluyendo tejido blando, tejido conjuntivo, hueso, órganos sólidos, vaso sanguíneo y similares. Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse o diagnosticarse mediante las composiciones de la invención incluyen cáncer, retinopatía diabética u otra, inflamación, artritis, reestenosis en vasos sanguíneos o injertos de vasos sanguíneos artificiales o dispositivos intravasculares y similares.

Los tipos de tumor que van a detectarse y tratarse según la invención son en general aquéllos que se encuentran 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 estados humanos y de otros animales, y no hay intención de limitar la aplicación de los métodos del presente documento a ningún tipo o variedad de tumor particular. Los tumores, como se sabe, incluyen una masa anómala de tejido que resulta de la división celular progresiva y descontrolada, y también se conocen normalmente como "neoplasia". Los métodos inventivos son útiles para células tumorales y células del estroma asociadas, tumores sólidos y tumores asociados con tejido blando, tales como, sarcoma de tejido blando, por ejemplo, en un ser humano. El tumor o cáncer puede estar ubicado en la cavidad oral y la faringe, el sistema digestivo, el sistema respiratorio, los huesos y las articulaciones (por ejemplo, metástasis óseas), tejido blando, la piel (por ejemplo, melanoma), mama, el sistema genital, el sistema 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 o cáncer primario. Los tejidos asociados con la cavidad oral incluyen, pero no se limitan a, la lengua y los tejidos de la boca. El cáncer puede surgir en tejidos del sistema digestivo incluyendo, por ejemplo, el esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, vesícula biliar y páncreas. Los cánceres del sistema respiratorio pueden afectar a la laringe, el pulmón y el bronquio e incluyen, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas. Los tumores pueden surgir en el cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, vulva, vagina, próstata, testículos y pene, que componen los sistemas genitales masculino y femenino, y la vejiga urinaria, riñón, pelvis renal y uréter, que constituyen el sistema urinario. El tumor o cáncer puede estar ubicado en la cabeza y/o el cuello (por ejemplo, cáncer de laringe y cáncer de paratiroides). El tumor o cáncer también puede estar ubicado en el sistema hematopoyético o sistema linfóide, e incluye, 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). Preferiblemente, el tumor está ubicado en la vejiga, hígado, ovario, riñón, intestino, cerebro o mama.

La proteína SPARC tiene afinidad por una amplia variedad de ligandos. Por tanto, el método inventivo para el suministro del agente terapéutico al sitio de enfermedad se basa en el hallazgo de que compuestos o ligandos, incluyendo albúmina, que tienen afinidad por SPARC pueden usarse para suministrar fármacos terapéuticos al sitio de enfermedad, con escaso o ningún suministro a tejidos normales.

Además se dan a conocer en el presente documento medios de transporte de la composición terapéutica a través de la barrera endotelial desde el vaso sanguíneo hasta el intersticio tumoral. El principal obstáculo en la terapia con anticuerpos y la quimioterapia es la traslocación a través de la barrera endotelial al interior del intersticio tumoral. La albúmina usa el mecanismo de transporte mediado por el receptor de albúmina para atravesar la barrera endotelial. Este mecanismo de transporte podría ser el mismo que los notificados en la bibliografía (gp60 y albondina) o mediante otros mecanismos no descubiertos. Se ha notificado previamente que el agente terapéutico acoplado sobre albúmina presenta una captación tumoral potenciada (Desai, N. *et al* Increased endothelial transcytosis of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) by endothelial gp60 receptors: a pathway inhibited by Taxol<sup>®</sup>), 27<sup>th</sup> Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) (2004), abstract n.º 1071). Además, la translocación potenciada a través de la barrera endotelial puede lograrse usando el mecanismo de transporte fisiológico de albúmina (Schnitzer, J.E.; Oh, P. J. Biol. Chem. 269, 6072-6082 (1994).

Para moléculas pequeñas, pueden realizarse modificaciones de modo que aumente la afinidad del fármaco por albúmina. Para formulaciones de moléculas pequeñas, puede eliminarse un disolvente que impida la unión del fármaco a albúmina. Alternativamente, la molécula pequeña puede unirse a albúmina, anticuerpo contra albúmina, fragmentos del mismo o ligandos para un receptor de albúmina tal como se describe a continuación.

Para moléculas biológicas tales como proteínas, anticuerpos y fragmentos de los mismos, es posible modificar mediante ingeniería genética los componentes biológicos con un péptido de unión a albúmina de tal manera que los componentes biológicos presentarán afinidad por albúmina. El péptido puede ser o bien una secuencia de unión a albúmina, o bien un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra albúmina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra transportadores de albúmina (tales como gp60/albondina/receptor *scavenger*/o receptor de TGF-beta) o bien anticuerpos frente a cualquiera de las proteínas que se encuentran en las caveolas, el transportador de albúmina. La

invención también contempla un anticuerpo o fragmento del mismo adecuado preparado como quimera con una valencia para SPARC y otra valencia para un efector del transporte transendotelial tal como gp60/albndina/receptor *scavenger*/o receptor de TGF-beta, o contra cualquiera de las proteínas que se encuentran en las caveolas de la célula endotelial.

5 Además se da a conocer en el presente documento un método para la destrucción de tejidos con expresión de SPARC tales como tumores y tejidos reestenósicos mediante fijación del complemento y/o reclutamiento de respuesta inmunitaria mediada por células mediante el anticuerpo frente a SPARC. En este caso, como en el de Rituxan, un anticuerpo anti-CD20, el resto efector es el fragmento Fc que puede mediar o bien en la activación del complemento con la destrucción directa de las células con expresión de SPARC o bien en el reclutamiento de  
10 células inmunitarias en los tejidos con expresión de SPARC con la destrucción de tejido resultante a través de una respuesta inmunitaria mediada por células.

Además se da a conocer en el presente documento un método para la inhibición de la actividad SPARC usando un anticuerpo neutralizante contra SPARC. El anticuerpo neutralizante tiene la capacidad para bloquear la interacción de SPARC con sus efectores *in vivo*. Por ejemplo, el anticuerpo neutralizante puede bloquear la interacción de  
15 SPARC con un componente de la superficie celular o la unión de SPARC a sus ligandos naturales tales como albúmina, factores de crecimiento y  $Ca^{2+}$ .

Además se da a conocer en el presente documento un método para determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero a la terapia anti-SPARC. El método comprende (a) aislar una muestra biológica del ser humano, (b) detectar la expresión de la proteína SPARC en la muestra biológica y (c) cuantificar la cantidad de proteína  
20 SPARC en la muestra biológica. Como la terapia anti-SPARC se basa en la unión del anticuerpo frente a SPARC a SPARC en el tejido enfermo, la presencia de SPARC en el tejido enfermo es necesaria para la actividad.

Además se da a conocer en el presente documento un método de uso de uno o más agentes de diagnóstico conjugados con los grupos de reconocimiento de SPARC, tales como los anticuerpos o fragmentos de los mismos, tal como se describió anteriormente. Los agentes de diagnóstico incluyen radioisótopos o radionúclidos, agentes de  
25 contraste para IRM, agentes de contraste para radiografías, agentes de contraste para ecografías y agentes de contraste para PET. Los métodos usados para la conjugación se conocen en la técnica.

La expresión de la proteína SPARC en una muestra puede detectarse y cuantificarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los métodos adecuados de detección y cuantificación de proteínas incluyen inmunotransferencia de tipo *Western*, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), tinción con plata, el  
30 ensayo de BCA (Smith *et al.*, Anal. Biochem. 150,76-85 (1985)), el ensayo de proteínas de Lowry (descrito en, por ejemplo, Lowry *et al.*, J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)), que es un ensayo colorimétrico basado en complejos de proteína-cobre y el ensayo de proteínas de Bradford (descrito en, por ejemplo, Bradford *et al.*, Anal. Biochem., 72, 248 (1976)), que depende del cambio de la absorbencia del azul de Coomassie G-250 tras su unión a la proteína. La biopsia del tumor puede analizarse mediante cualquiera de los métodos anteriores o puede analizarse mediante  
35 inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-SPARC (o bien monoclonal o bien policlonal) junto con un sistema de visualización apropiado (es decir, sustrato de HRP y anticuerpo secundario conjugado con HRP).

Puede usarse en el método inventivo cualquier anticuerpo contra SPARC adecuado, siempre que el anticuerpo presente unión específica a SPARC. El anticuerpo puede ser o bien monoclonal o bien policlonal; y puede o bien producirse a través de la inmunización de un animal o bien producirse a través de tecnología de ADN recombinante tal como presentación en fago y mutagénesis *in vitro* o síntesis de las regiones variables de los genes de las  
40 cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Los anticuerpos policlonales incluyen, pero no se limitan a anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados derivados de animales tales como aves (por ejemplo, gallina), roedores (por ejemplo, rata, ratón, hámster, cobaya), vaca, cabra, oveja, conejo y similares. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos derivados de un único clon de células productoras de anticuerpo incluyendo, pero sin limitarse a,  
45 células humanas y anticuerpos derivados de las células de otros tipos de animal, por ejemplo, gallina, conejo, rata, ratón, hámster, cobaya, vaca, cabra, oveja, y similares. Los anticuerpos sintéticos incluyen anticuerpos producidos usando tecnología de ADN recombinante mediante ingeniería genética de las regiones variables de los genes de las cadenas pesada y ligera. Los anticuerpos sintéticos también incluyen fragmentos de anticuerpo sintetizados químicamente con actividad de unión a SPARC o anticuerpos derivados de presentación en fago o  
50 tecnología similar.

Para uso humano, para evitar la inmunogenidad y la respuesta inmunitaria, se prefiere usar anticuerpo anti-SPARC humanizado o fragmentos adecuados tales como Fab', Fab o Fab2. El anticuerpo humanizado o fragmentos del mismo pueden producirse, por ejemplo, usando uno de los siguientes métodos establecidos: 1) el anticuerpo humanizado puede construirse usando la estructura principal de IgG humana que reemplaza la región CDR variable  
55 por la del anticuerpo contra SPARC, en el que las cadenas pesada y ligera se expresan independientemente bajo promotores independientes o se coexpresan bajo un promotor con una secuencia de IRES; 2) el anticuerpo monoclonal humanizado puede producirse contra SPARC usando un ratón modificado mediante ingeniería genética para tener un sistema inmunitario humano; 3) el anticuerpo humanizado contra SPARC puede producirse usando fagémido (M13, colifago lambda, o cualquier sistema de fago que pueda producir la presentación en superficie). Para  
60 construir el anticuerpo de longitud completa, la región variable puede transferirse sobre la CDR de ambas de la

cadena pesada y la cadena ligera. La coexpresión de la cadena pesada y la cadena ligera en células de mamífero tales como CHO, 293, o células mieloides humanas da como resultado el anticuerpo de longitud completa. De manera similar, pueden prepararse fragmentos Fab', Fab o Fab2 y anticuerpos de cadena sencilla usando métodos bien establecidos.

5 El anticuerpo contra SPARC tampoco se limita al anticuerpo completo o fragmento del anticuerpo que conserva el sitio de unión para SPARC (por ejemplo, Fab y Fab2). El anticuerpo tampoco se limita a una clase cualquiera de anticuerpo, por ejemplo, IgM, IgA, IgG, IgE, IgD e IgY. El anticuerpo tampoco se limita a un anticuerpo divalente, monovalente o quimera con una valencia para SPARC y otra para un efector tal como tTF o ricina A. El anticuerpo humanizado no se limita a IgG. Las mismas tecnologías pueden usarse para generar todas las demás clases de anticuerpos tales como IgE, IgA, IgD, IgM, teniendo cada una diferentes actividades de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) apropiadas para una diana de enfermedad particular. Pueden generarse fragmentos funcionales del anticuerpo mediante proteólisis limitada. Estos fragmentos pueden ser monovalentes tales como Fab' o divalentes, tales como Fab2. También pueden sintetizarse fragmentos como scFv de cadena sencilla o diacuerpos en *E. coli*.

15 La invención proporciona además una composición que comprende un agente farmacéuticamente activo que puede ejercer directamente su efecto farmacológico o un agente farmacéuticamente activo acoplado a un compuesto que puede unirse a SPARC u otro radical de unión a albúmina y un portador farmacéuticamente aceptable. El agente de suministro, que puede ser una composición farmacéutica, que comprende el agente farmacéuticamente activo acoplado a un grupo de reconocimiento de SPARC se administra al mamífero, tal como un ser humano, en una cantidad tal que se suministre una cantidad terapéuticamente eficaz del agente farmacéuticamente activo al mamífero.

25 Se da a conocer en el presente documento un método para suministrar un agente quimioterápico a un tumor en un mamífero. El método comprende administrar a un ser humano u otro mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende el agente quimioterápico acoplado a un compuesto o ligando que puede unirse a una proteína SPARC y un portador farmacéuticamente aceptable. Las descripciones del agente quimioterápico, el tumor, el mamífero y los componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones de la invención también pueden aplicarse a esos mismos aspectos del método mencionado anteriormente de suministro de un agente quimioterápico a un tumor.

30 Preferiblemente, la composición farmacéutica no comprende más del 50% del agente terapéutico en forma de nanopartícula. Más preferiblemente, la composición farmacéutica no comprende más del 10% del agente terapéutico en forma de nanopartícula. Incluso más preferiblemente, la composición farmacéutica no comprende más del 5%, o más del 4% o más del 3% del agente terapéutico en forma de nanopartícula. En una realización más preferida, la composición farmacéutica no comprende más del 2% o, más del 1% del agente terapéutico en forma de nanopartícula. Lo más preferiblemente, la composición farmacéutica no comprende ninguna cantidad del agente terapéutico en forma de nanopartícula.

40 Además se da a conocer en el presente documento un método de suministro de un agente quimioterápico a un tumor en un ser humano u otro mamífero. El método comprende administrar a un ser humano u otro mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de suministro, tal como una composición farmacéutica, en el que el agente de suministro (por ejemplo, composición farmacéutica) comprende el agente quimioterápico acoplado al grupo de reconocimiento de SPARC. Por ejemplo, el agente quimioterápico puede acoplarse a un grupo de reconocimiento de SPARC tal como un anticuerpo que reconoce proteína SPARC, o el anticuerpo frente a SPARC solo. Las composiciones farmacéuticas incluyen preferiblemente el agente quimioterápico acoplado al grupo de reconocimiento de SPARC y un portador farmacéuticamente aceptable. Las descripciones del agente quimioterápico, el tumor, el mamífero y los componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones de la invención también pueden aplicarse a esos mismos aspectos del método mencionado anteriormente de suministro de un agente quimioterápico a un tumor.

50 Además se da a conocer en el presente documento un método de suministro de un agente farmacéuticamente activo a modo de grupo de reconocimiento de SPARC a un sitio de enfermedad que se caracteriza por la sobreexpresión de SPARC u otro marcador o proteína de unión a albúmina en un ser humano, u otro animal que exprese tal proteína o marcador. Tales enfermedades incluyen estados anómalos de proliferación, remodelación tisular, hiperplasia y cicatrización de heridas exagerada en tejido corporal (por ejemplo, tejido blando, tejido conjuntivo, hueso, órganos sólidos, vaso sanguíneo y similares). Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse 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. Las descripciones del agente farmacéuticamente activo, el tumor, el mamífero y los componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones de la invención también pueden aplicarse a esos mismos aspectos del método mencionado anteriormente de suministro de un agente farmacéuticamente activo.

Además se da a conocer en el presente documento un método para el suministro de un agente farmacéuticamente activo (por ejemplo, anticuerpo frente a SPARC solo o agente quimioterápico conjugado con un grupo de reconocimiento de SPARC tal como anticuerpo frente a SPARC, anticuerpo frente a SPARC radiomarcado y similares) a un sitio de enfermedad que se caracteriza por la sobreexpresión de SPARC en un ser humano u otro animal que exprese tal proteína o marcador. Tales enfermedades incluyen estados anómalos de proliferación, remodelación tisular, hiperplasia y cicatrización de heridas exagerada en tejido corporal (por ejemplo, tejido blando, tejido conjuntivo, hueso, órganos sólidos, vaso sanguíneo y similares). Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse o diagnosticarse administrando una composición farmacéutica que comprende terapia anti-SPARC, incluyen cáncer, retinopatía diabética u otra, inflamación, artritis, reestenosis en vasos sanguíneos, injertos de vasos sanguíneos artificiales o dispositivos intravasculares, y similares. Las descripciones del agente farmacéuticamente activo, el tumor, el mamífero y los componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones también pueden aplicarse a esos mismos aspectos del método mencionado anteriormente de suministro de un agente farmacéuticamente activo.

En otras realizaciones, el método comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente quimioterápico acoplado a un compuesto o ligando que puede unirse a la proteína SPARC. El agente quimioterápico puede acoplarse al compuesto o ligando que puede unirse a la proteína SPARC usando cualquier método adecuado. Preferiblemente, el agente quimioterápico se acopla químicamente al compuesto mediante enlaces covalentes incluyendo, por ejemplo, enlaces disulfuro.

Además se da a conocer en el presente documento un método que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente quimioterápico o elemento radiactivo acoplado a un grupo de reconocimiento de SPARC. El agente quimioterápico o radiactivo puede acoplarse al anticuerpo que reconoce SPARC usando cualquier método adecuado. Preferiblemente, el agente quimioterápico puede acoplarse químicamente al compuesto mediante enlaces covalentes incluyendo, por ejemplo, enlaces disulfuro.

Preferiblemente, el compuesto o ligando útil en el método puede unirse a la proteína SPARC. En una realización preferida de la invención, el compuesto es un ligando que se une a una proteína SPARC. Los ejemplos de ligandos adecuados incluyen catión de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), catión de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), catión de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), colágeno (por ejemplo, colágeno I, colágeno II, colágeno III, colágeno IV, colágeno V y colágeno IX), vitronectina, trombospondina 1, células endoteliales, plaquetas, albúmina y cationes de hidroxapatita. En otra realización preferida de la invención, el compuesto es una molécula pequeña. El término "molécula pequeña" se refiere a cualquier molécula que tiene un peso molecular menor de aproximadamente 600. Los ejemplos de moléculas pequeñas adecuadas incluyen una proteína, un ácido nucleico, un hidrato de carbono, un lípido, una coenzima (por ejemplo, una vitamina), un antígeno, una hormona y un neurotransmisor. Preferiblemente, la molécula pequeña es un producto químico (por ejemplo, un producto químico orgánico o inorgánico) un péptido o peptidomimético, una proteína o un hidrato de carbono. En aún otra realización preferida de la invención, el compuesto es un anticuerpo dirigido contra una proteína SPARC. Cualquier anticuerpo adecuado, o fragmento del mismo, que se une a una proteína SPARC puede usarse en el método inventivo.

Se ha demostrado la expresión de SPARC en tejidos tumorales, en casi todos los tipos de cáncer. Se ha evidenciado que la elaboración de SPARC en tejidos tumorales puede derivarse o bien de la expresión tumoral de SPARC o bien mediante células del estroma. El fenotipo de SPARC del tumor puede transformarse de negativo para SPARC a positivo para SPARC mediante la administración de SPARC exógena. Por consiguiente, el tumor positivo para SPARC se volvería entonces sensible a los agentes quimioterápicos. Alternativamente, SPARC podría radiomarcarse o conjugarse con diversas toxinas para conferirle la capacidad para destruir el tumor directa o indirectamente.

SPARC puede sintetizarse y purificarse usando tecnologías conocidas. Pueden generarse células que expresan SPARC exógena colocando el ADNc/gen estructural de SPARC bajo el control de un promotor fuerte/inicio de traducción y el vector transfectado en células mamíferas para dirigir la expresión de SPARC en estas células. Alternativamente, puede expresarse SPARC usando baculovirus u otros virus tales como adenovirus. Puede purificarse la SPARC expresada por estas células mediante métodos de purificación tradicionales tales como cromatografía de intercambio iónico, de exclusión molecular o C18. La SPARC purificada puede formularse en solución salina con conservantes y administrarse por vía intravenosa, mediante aerosol, mediante inyección subcutánea, u otros métodos.

Además se da a conocer en el presente documento un método para el suministro de un agente quimioterápico a un tumor en un mamífero. El método comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende el agente quimioterápico acoplado a una proteína SPARC que puede unirse a albúmina y un portador farmacéuticamente aceptable. Las descripciones del agente quimioterápico, el tumor, el mamífero y los componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones de la invención también pueden aplicarse a esos mismos aspectos del método mencionado anteriormente de suministro de un agente quimioterápico a un tumor.



Para su uso *in vivo*, el agente quimioterápico acoplado a un compuesto o ligando que puede unirse a la proteína SPARC se formula de manera deseable en una composición farmacéutica que comprende un portador fisiológicamente aceptable. Cualquier portador fisiológicamente aceptable adecuado puede usarse dentro del contexto de la invención, y tales portadores se conocen bien en la técnica.

- 5 Para su uso *in vivo*, el agente de terapia anti-SPARC se formula de manera deseable en una composición farmacéutica que comprende un portador fisiológicamente aceptable. Cualquier portador fisiológicamente aceptable adecuado puede usarse dentro del contexto de la invención, y tales portadores se conocen bien en la técnica.

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

15 Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, o bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su uso para preparar disoluciones o suspensiones tras la adición 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 en la medida en que exista una inyectabilidad facilitada. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse 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, mezcladas adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxixelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En las condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

20

25

30 El agente quimioterápico (por ejemplo, terapia anti-SPARC) acoplado a un compuesto o ligando que se une a una proteína SPARC puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas por los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, 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 férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

35 La composición puede comprender además 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 métodos son meramente a modo de ejemplo y no son en modo alguno limitativos.

40 Las formulaciones adecuadas para administración mediante inhalación incluyen formulaciones de aerosol. Las formulaciones de aerosol pueden colocarse en propelentes aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También pueden formularse como preparaciones no presurizadas, para el suministro desde un nebulizador o un atomizador.

45 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones inyectables isotónicas estériles, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con respecto a la sangre del receptor destinado y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo 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, granulados y comprimidos del tipo descrito anteriormente. En una realización preferida de la invención, el agente quimioterápico acoplado a un compuesto que se une a una proteína SPARC (por ejemplo, terapia anti-SPARC) se formula para inyección (por ejemplo, administración parenteral). Con respecto a esto, la formulación es adecuada de manera deseable para la administración intratumoral, pero también puede formularse para inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, y similares.

50

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

Además, la composición puede comprender agentes terapéutica o biológicamente activos. 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 asociadas con la administración *in vivo* de la composición farmacéutica y el trastorno fisiológico.

- 5 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero no deben interpretarse que limitan en modo alguno su alcance.

#### EJEMPLO 1

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

- 10 Las nanopartículas de paclitaxel-albúmina (Abraxane, ABX o ABI-007) han mostrado tener una tasa de respuesta mejorada con respecto a Taxol (TAX) en un ensayo de cáncer de mama metastásico de fase 3 (el 33% frente al 19%,  $p < 0,0001$ ) (véase, por ejemplo, O'Shaughnessy, SABCS). Se demostró recientemente el transporte transendotelial de paclitaxel (P) mediado por albúmina y el aumento de la acumulación de paclitaxel intratumoral 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)).

- 15 La línea celular tumoral MX-1 se deriva de un cáncer de mama humano. Se sometieron a inmunotinción criosecciones en serie de xenoinjerto de tumor MX-1 humano, tejidos del tumor de mama primario humano ( $n=141$ ) y tejido de mama humano normal ( $n=115$ ) y se puntuaron (0-4) para albúmina, SPARC (usando anticuerpo anti-SPARC) y tinción de caveolina 1. También se sometieron a inmunotinción células de MX-1 cultivadas, con SPARC. Se prepararon nanopartículas de paclitaxel-albúmina (Abraxane, ABX o ABI-007) y Taxol (TAX) con paclitaxel radiactivo (P) (20 mg/kg por vía i.v.) y se usaron para determinar la biodistribución del paclitaxel en tejidos normales de ratones atímicos.

- 20 La tinción de albúmina en el tumor MX-1 fue focal y se localizó conjuntamente con SPARC (figura 1). La tinción con caveolina 1 confirmó que la densidad de vasos sanguíneos en las áreas que contienen albúmina no fue diferente a la de las áreas libres de albúmina. Se confirmó la expresión de SPARC por las células de MX-1 cultivadas mediante tinción positiva con anticuerpo anti-SPARC. La acumulación de paclitaxel en tejidos normales (negativos para SPARC) fue significativamente menor para ABX en comparación con TAX ( $p \leq 0,004$ ) para 7/10 tejidos. El 46% de los tumores de mama primarios humanos presentó una tinción de SPARC intensa (puntuación  $\geq 2$ ), en comparación con el 1% para tejidos normales ( $p < 0,0001$ ). En un subconjunto de 50 tejidos tumorales, la expresión de SPARC no se correlacionó con la tinción, el estado de ER o estado de PgR; sin embargo, hubo una tendencia hacia una alta expresión de SPARC entre tumores negativos para p53.

- 25 La localización conjunta de albúmina y SPARC sugiere que SPARC, por su actividad de unión a albúmina, puede comportarse como una diana intratumoral para unirse a albúmina en tumores de mama. Como el transporte de paclitaxel en ABX depende de albúmina (véase, por ejemplo, Desai SABCS, 2003), esto puede explicar la acumulación tumoral mejorada de ABX en comparación con TAX. La acumulación de ABX en tejidos normales fue menor que para TAX, lo que concuerda con la falta de expresión de SPARC en tejidos normales. La selección de pacientes para SPARC permite la identificación de pacientes con mayor respuesta a ABX. La presencia de SPARC en estos tumores permite el direccionamiento y la terapia usando el anticuerpo anti-SPARC.

#### EJEMPLO 2

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

- 40 Se cultivaron células de MX-1 en un portaobjetos y se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra SPARC humana usando métodos conocidos en la técnica. Se observó tinción de anticuerpo, que demuestra que MX-1 está expresando SPARC. Estos resultados sugieren que la expresión de SPARC detectada en las células de tumor MX-1 es el resultado de la secreción de SPARC por las células de tumor MX-1. La tinción fue más intensa para las células de tumor MX-1 que la de células primarias normales tales como HUVEC (células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano), HLMVEC (células endoteliales de microvasos de pulmón humano) y HMEC (células epiteliales de mama humanas). Aunque la mayoría de la tinción de SPARC fue SPARC interna, se detectó un nivel significativo de SPARC de superficie tal como se demostró mediante microscopía confocal y tinción de células no permeabilizadas.

#### EJEMPLO 3

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

- 50 Se determinó la expresión de SPARC en células de carcinoma de mama humano usando una disposición de tumores de Cybrdi, Inc. (Gaithersburg, MD). Los resultados de este análisis se exponen en la tabla 1. Se puntuó la intensidad de la tinción desde "negativo" hasta +4, correspondiendo el número más alto a la mayor intensidad de sobreexpresión. El 49% de carcinoma de mama se tiñó de manera positiva (de +2 y superior) para SPARC, en comparación con el 1% de tejido ( $p < 0,0001$ ).

	Tinción de SPARC (%)					
	Negativo	-/+	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 4

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

5 Las nanopartículas de paclitaxel-albúmina (P) (Abraxane, ABX o ABI-007) demostraron una tasa de respuesta mejorada con respecto a Taxol en un ensayo de cáncer de mama metastásico de fase III (el 33% frente al 19%,  $p < 0,0001$ ) (SABCS, O'Shaughnessy *et al.*, 2003). Cremophor en Taxol (TAX) atrapa P en micelas en plasma, reduciendo el paclitaxel disponible para el reparto celular (véase, por ejemplo, Sparreboom *et al.*, Cancer. Res., 59, 1454 (1999)). Estudios en ratones atímicos han mostrado concentraciones de paclitaxel intratumoral el 30-40% mayores con ABX en comparación con dosis iguales de TAX (SABCS, Desai *et al.*, 2003). La albúmina se transporta a través de las células endoteliales (EC) mediante transporte caveolar mediado por un receptor específico (gp60) (véase, por ejemplo, John *et al.*, Am. J. Physiol., 284, L187 (2001)). Se planteó la hipótesis de que el paclitaxel unido a albúmina en ABX puede transportarse a través de EC de microvasos tumorales por gp60 y este mecanismo puede ser particularmente activo en ABX en comparación con TAX.

15 Se realizaron una serie de experimentos para evaluar la unión y el transporte de paclitaxel por células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) y células endoteliales de microvasos de pulmón humano (HLMVEC) con ABX y TAX. Se usó paclitaxel fluorescente (FP) como sonda y se formularon ABX y TAX fluorescentes con FP para examinar con sonda la unión y el transporte de paclitaxel a través de monocapas de EC cultivadas en un aparato Transwell.

20 La unión de paclitaxel a las células (HUVEC) fue 10 veces mayor para ABX que para TAX. El transporte de paclitaxel desde ABX a través de monocapas de EC se potenció 2-3 veces y 2-4 veces para HUVEC y HMVEC, respectivamente, en comparación con TAX. El transporte dependía de albúmina. Se inhibió el transporte de paclitaxel desde ABX por la presencia de anticuerpo anti-SPARC, que se sabe que se une a gp60, el receptor requerido para la transcitosis caveolar de albúmina. Inhibidores de la transcitosis caveolar conocidos, NEM y  $\beta$ -metilciclodextrina (BMC), también inhibieron el transporte de paclitaxel desde ABX a través de las monocapas endoteliales (figura 2). La inhibición del transporte caveolar disminuyó el transporte de P desde ABX hasta el nivel de transporte de TAX.

25 Estos resultados demuestran que el paclitaxel desde ABX se transporta de manera activa a través de EC mediante transcitosis caveolar mediada por gp60, mientras que P desde TAX parece transportarse a una tasa 2-4 veces menor principalmente mediante un mecanismo paracelular (no caveolar). Esta ruta puede ser en parte responsable del aumento de las concentraciones intratumorales de paclitaxel observadas para ABX en relación con TAX. Cremophor en TAX inhibe la transcitosis de paclitaxel a través de células endoteliales.

## EJEMPLO 5

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

35 En estudios clínicos de fase I y II de pacientes con carcinoma de células escamosas (SCC) de cabeza y cuello (H&N, *head and neck*) y conducto anal, se observaron tasas de respuesta del 78% y el 64%, respectivamente, para paclitaxel unido a albúmina en nanopartícula suministrado por vía intraarterial (Abraxane, ABX o ABI-007) (véanse, por ejemplo, Damascelli *et al.*, Cancer, 92(10), 2592-2602 (2001) y Damascelli *et al.*, AJR, 181, 253-260 (2003)). Al comparar la toxicidad *in vitro* de ABX y Taxol (TAX), se observó que una línea cervicouterina escamosa (A431) demostró  $CI_{50}$  mejoradas para ABX (0,004  $\mu\text{g/ml}$ ) frente a TAX (0,012  $\mu\text{g/ml}$ ). Se demostró recientemente el transporte caveolar transendotelial mediado por albúmina de paclitaxel (P) y el aumento de la acumulación intratumoral de P para ABX frente a TAX (véase, por ejemplo, Desai, SABCS 2003).

45 Se sometieron a inmunotinción tejidos tumorales de H&N humanos ( $n=119$ ) y tejido de H&N humano normal ( $n=15$ ) y se puntuaron (0-4) para la tinción de SPARC usando una disposición de tejidos tumorales y normales. Se realizó la inmunotinción usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-SPARC. En un nuevo estudio de modificación a escala de la dosis de fase I (ABX administrado por vía i.v. durante 30 minutos q3w), se analizó un subconjunto de pacientes con cáncer de cabeza y cuello ( $n=3$ ) para determinar la respuesta a ABX.

50 Se sobreexpresó SPARC (puntuación  $\geq 2$ ) en el 60% (72/119) de los tumores de H&N frente al 0% (0/15) en tejidos normales ( $p < 0,0001$ ). En el estudio de fase I, 2/3 de los pacientes de H&N lograron una respuesta parcial (PR) tras 2 ciclos de tratamiento a niveles de dosis de 135  $\text{mg/m}^2$  (1 pt) y 225  $\text{mg/m}^2$  (1 pt). Un tercer paciente progresó a 260  $\text{mg/m}^2$ .

Se halló que se sobreexpresaba SPARC en el 60% de tumores de células escamosas de H&N. Esto puede explicar la alta actividad como único agente de ABX observada previamente en cánceres de células escamosas de H&N debido a la unión de paclitaxel unido a albúmina a SPARC expresada en estos tumores. 2/3 de los pacientes con tumores de células escamosas de H&N lograron una PR en un nuevo estudio de fase I.

5 • Tinción de SPARC:

-----	0	-/+	1	2	3	4
Disposición de tumores H&N:						
- Carcinoma	17 (14%)	14 (12%)	16 (13%)	23 (19%)	20 (17%)	29 (24%)
- Normal	13 (87%)	0 (0%)	2 (13%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

10 Se sometieron a inmunotinción tejidos tumorales de H&N humanos (n=119) y tejido de H&N humano normal (n=15) y se puntuaron (0-4) para la tinción de SPARC usando una disposición de tejidos tumorales y normales. Se realizó la inmunotinción usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-SPARC. Se sobreexpresó SPARC (puntuación  $\geq 2$ ) en el 60% (72/119) de los tumores de H&N frente al 0% (0/15) en tejidos normales ( $p < 0,0001$ ). Esto puede explicar la alta actividad como único agente de ABX observada previamente en cánceres de células escamosas de H&N debido a la unión del paclitaxel unido a albúmina a SPARC expresada en estos tumores

15 En un nuevo estudio de modificación a escala de la dosis de fase I (ABX administrado por vía i.v. durante 30 minutos q3w), se analizó un subconjunto de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (n=3) para determinar la respuesta a ABX. En el estudio de fase I, 2/3 de los pacientes de H&N lograron una respuesta parcial (PR) tras 2 ciclos de tratamiento con niveles de dosis de 135 mg/m<sup>2</sup> (1 pt) y 225 mg/m<sup>2</sup> (1 pt). Un tercer paciente progresó a 260 mg/m<sup>2</sup>.  
20 Se tiñeron tejidos tumorales de estos pacientes para SPARC y 1 paciente que respondió mostró una fuerte sobreexpresión para SPARC.

En otro estudio clínico de fase II de pacientes con carcinoma de células escamosas (SCC) de cabeza y cuello (H&N) tratados con Abraxane por vía intraarterial, se indicó una tasa de respuesta global del 68%. En 10 pacientes que respondieron cuyos tejidos se analizaron por tinción de SPARC, se halló que el 70% sobreexpresaba fuertemente SPARC.

25 EJEMPLO 6

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

30 Se cultivaron células de MX-1 en un portaobjetos y se permeabilizaron con agentes adecuados. Se expusieron las células a albúmina fluorescente y tras lavado se expusieron al anticuerpo frente a SPARC. Esto estuvo seguido por la exposición a un anticuerpo secundario que tenía una etiqueta fluorescente diferente de la de la albúmina. Se observó sorpresivamente que la albúmina marcada se localizaba conjuntamente con la presencia de SPARC dentro de la célula, indicando que la albúmina se internalizó rápidamente y se dirigió a SPARC intracelular.

EJEMPLO 7

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

Se cultivaron células endoteliales de microvasos de pulmón humano (HLMVEC) hasta la confluencia en un aparato Transwell. Se añadió la composición farmacéutica inventiva que comprende paclitaxel y albúmina, o Taxol que contiene paclitaxel fluorescente (Flutax) a una concentración de 20 µg/ml, a la cámara superior del aparato Transwell.

40 Se monitorizó de manera continua el transporte de paclitaxel mediante transcitosis desde la cámara superior hasta la cámara inferior usando un fluorímetro. También se usó un control que contenía sólo Flutax sin albúmina. El control con Flutax no mostró transporte, validando la integridad de la monocapa de HLMVEC confluyente. El transporte de paclitaxel desde la composición de albúmina-paclitaxel fue mucho más rápido que el de paclitaxel desde Taxol en presencia de HSA al 5% (concentración fisiológica). Las constantes de velocidad de transporte ( $K_t$ ) para la  
45 composición de albúmina-paclitaxel y para Taxol fueron de 1,396 h<sup>-1</sup> y 0,03 h<sup>-1</sup> respectivamente. La cantidad total de paclitaxel transportado a través de la monocapa fue tres veces mayor para la composición de albúmina-paclitaxel que para Taxol. Por tanto, el uso de albúmina u otro mimético adecuado incluyendo anticuerpos o fragmentos contra el receptor gp60 u otros receptores de células endoteliales puede ayudar en el transporte de un agente terapéutico deseado a través de la barrera endotelial hacia el intersticio tumoral.

50 EJEMPLO 8

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

5 Se preparó un extracto de células completas de células HUVEC mediante sonicación. Se separó la proteína 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 en una única banda a 38 kDa, el peso molecular correcto para SPARC. Cuando se analizó MX-1 mediante el mismo método, se detectó SPARC tanto en el lisado de células clarificado como en la fracción de membrana rica en membrana.

#### EJEMPLO 9

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

10 Se sometieron a inmunotinción tejido normal humano y de ratón y se puntuaron (0-4) para la tinción SPARC usando una disposición de tejidos tumorales y normales. Se realizó la inmunotinción usando anticuerpo policlonal de conejo anti-SPARC. No se expresó SPARC en ninguno de los tejidos normales, con la excepción del esófago. Igualmente, no se expresó SPARC en ninguno de los tejidos normales de ratón, excepto en el riñón del ratón hembra. Sin embargo, es posible que esta expresión se debiera a la folistatina que es homóloga a SPARC.

#### Expresión de SPARC en tejidos normales humanos

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

#### Tejidos normales de ratón

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

45 El uso de los términos “un/o” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) ha de 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, significando “incluyendo, pero sin limitarse a”,) a menos que se indique de otra manera. La cita de intervalos de valores en el presente documento están meramente destinados a servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor independiente que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor independiente se incorpora en la memoria descriptiva como si se citase individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente

5 documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o a menos que se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento, pretende meramente ilustrar mejor la invención y no impone una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica que comprende paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC, en la que dicho anticuerpo se une específicamente a SPARC/osteonectina que es una glicoproteína de 38 kD, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. Uso de paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC que se une específicamente a SPARC/osteonectina que es una glicoproteína de osteonectina de 38 kD, en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer en un mamífero.
3. Paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC que se une específicamente a SPARC/osteonectina que es una glicoproteína de osteonectina de 38 kD, para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero.
- 10 4. Uso según la reivindicación 2 o paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC para su uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es monoclonal.
5. Uso o paclitaxel acoplado a un anticuerpo anti-SPARC para su uso según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es humanizado.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es monoclonal.
- 15 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que el anticuerpo es humanizado.

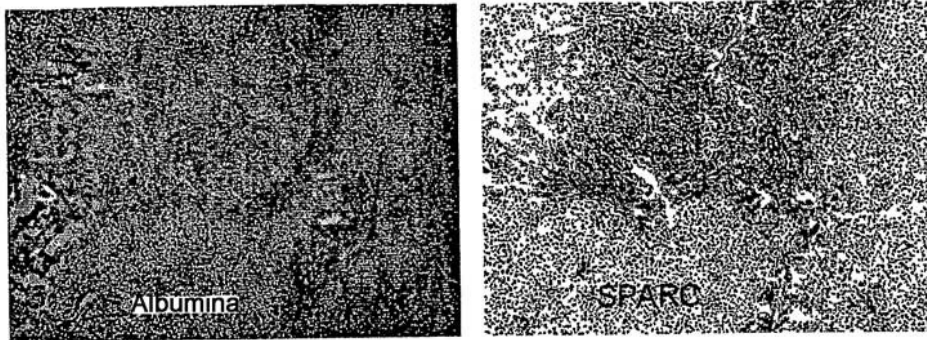


Figura 1. Localización conjunta de albúmina y SPARC en secciones en serie de un tumor con xenoinjerto MX-1.



Figura 2. Transcitosis de paclitaxel a través de monocapas de células endoteliales

