

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 076**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2007 PCT/US2007/065486**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2008 WO08060651**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2007 E 07868202 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2010919**

54 Título: **SPARC y métodos de uso de la misma**

30 Prioridad:

31.03.2006 US 788208 P

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

23.10.2018

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 2 687 076 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

SPARC y métodos de uso de la misma

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere al uso de un agente quimioterápico que comprende partículas de paclitaxel unido a albúmina del cual más del 50% del paclitaxel está en forma de nanopartícula para tratar un tumor de mama, que comprende la etapa de detección de la expresión de proteína SPARC y la presencia de expresión de Her2 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica que se ha aislado del tumor, en el que el agente quimioterápico va a administrarse al mamífero si se identificó estado de Her2 positivo y expresión de SPARC positiva como tinción > 2+.

Antecedentes de la invención

- 10 Las formulaciones de nanopartículas de albúmina han demostrado reducir la toxicidad de agentes terapéuticos escasamente solubles. Por ejemplo, la patente estadounidense 6.537.579 da a conocer una formulación de paclitaxel en nanopartículas de albúmina que carece de emulsionantes tóxicos.

- El agente anticancerígeno paclitaxel, comercializado con la marca comercial Taxol® por Bristol Myers Squibb, está aprobado actualmente para el tratamiento de varios cánceres incluyendo cáncer de ovario, de pulmón y de mama. La principal limitación del uso de paclitaxel es su escasa solubilidad. Por consiguiente, la formulación Taxol® contiene Cremophor® EL como vehículo solubilizante, pero la presencia de Cremophor® en esta formulación se ha vinculado con varias reacciones de hipersensibilidad intensas 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® requieren medicación previa con corticosteroides (dexametasona) y antihistamínicos para reducir la hipersensibilidad y anafilaxia que se producen debido a la presencia de Cremophor®.

- En cambio, Abraxane®, también conocido como ABI-007, es una formulación de paclitaxel en nanopartículas de albúmina que carece de Cremophor®, 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 algunos estudios clínicos, se ha demostrado 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®.

- Otra ventaja de la formulación en nanopartículas de albúmina es que al excluir emulsionantes tóxicos es posible administrar mayores dosis de paclitaxel a intervalos más frecuentes de lo que es actualmente posible con Taxol®. Existe el potencial de que podría observarse una eficacia potenciada en tumores sólidos como consecuencia de (i) mayores dosis tolerables (300 mg/m²), (ii) semivida más larga, (iii) disponibilidad tumoral local prolongada y/o (iv) liberación sostenida *in vivo*. Abraxane® reduce las reacciones de hipersensibilidad mientras que mantiene o mejora el efecto quimioterápico del fármaco.

- Se sabe que las partículas o nanopartículas coloidales de tamaño <200 nm tienden a concentrarse en el sitio de tumor debido a vasculaturas permeables. 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 de tumor puedan dar como resultado una liberación lenta del fármaco en el sitio de tumor dando como resultado una mayor eficacia en comparación con la administración del fármaco en su forma solubilizada (que contiene Cremophor®).

- 40 Tales formulaciones en nanopartículas comprenden al menos aproximadamente el 50% del agente activo en forma de nanopartícula. Además, tales formulaciones en 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 en nanopartículas comprenden al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 98% del agente activo en forma de nanopartícula.

- 45 La proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (SPARC), también conocida como osteonectina, es una glicoproteína de 281 aminoácidos. SPARC tiene afinidad por una amplia variedad de ligandos incluyendo cationes (por ejemplo, Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺), factores de crecimiento (por ejemplo, factor 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 hidroxipatita. 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 una 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.

- 55 SPARC es una proteína matricelular regulada por incremento en varios cánceres agresivos, pero está ausente en tejidos normales (Porter *et al.*, J. Histochem. Cytochem., 43, 791(1995)). Efectivamente, la expresión de SPARC se induce entre una variedad de tumores (por ejemplo, de vejiga, hígado, ovario, riñón, intestino y mama). En cáncer de vejiga, por ejemplo, la expresión de SPARC se ha asociado con carcinoma avanzado. Se ha demostrado que los

tumores de vejiga invasivos de estadio T2 o mayor expresan mayores niveles de SPARC que los tumores de vejiga de estadio T1 (o tumores menos superficiales) y tienen peor pronóstico (véase, por ejemplo, Yamanaka *et al.*, *J. Urology*, 166, 2495-2499 (2001)). En meningiomas, la expresión de SPARC se ha asociado con tumores invasivos únicamente (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 localizado (véase, por ejemplo, Bellahcene, *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 146, 95-100 (1995)) y el 54,2% de los carcinomas ductales infiltrantes 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 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 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)). El documento WO 2005/007952 A (American Bioscience, Inc.) del 15 de diciembre de 2005 da a conocer un método para determinar la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterápico que comprende detectar y cuantificar la proteína SPARC en una muestra aislada del mamífero, incluyendo del tumor o en líquidos corporales como LCR, sangre, plasma, suero y orina. El documento WO 2005/066371 se refiere a métodos para predecir la respuesta de un cáncer de ovario humano a quimioterapia, y a métodos para monitorizar la eficacia del tratamiento, particularmente un tratamiento quimioterapéutico, en una paciente tratada de cáncer de ovario, detectando y cuantificando el producto génico o la expresión génica de SPARC en una muestra biológica de la paciente.

La terapia con anticuerpos es un método eficaz para controlar la enfermedad en el 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 frente a SPARC representaría un agente terapéutico importante para tratar tumores de seres humanos y de otros mamíferos, así como otros trastornos proliferativos, hiperplásicos, de remodelación e inflamatorios que expresan la proteína SPARC. Además, un anticuerpo frente a SPARC conjugado con un agente de contraste o de obtención de imágenes sería un medio de detección y diagnóstico de tales trastornos.

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

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona las siguientes realizaciones definidas en los puntos 1-4 a continuación:

1. Un agente quimioterápico para su uso en un método de tratamiento de un tumor de mama en un mamífero, que comprende la etapa de detección de la expresión de la proteína SPARC y la presencia de expresión de Her2 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica que se ha aislado del tumor, en el que el agente quimioterápico va a administrarse al mamífero si se identificó estado de Her2 positivo y expresión de SPARC positiva como tinción > 2+, y en el que el agente quimioterápico comprende partículas de paclitaxel unido a albúmina del cual más del 50% del paclitaxel está en forma de nanopartícula.

2. El agente para su uso según el punto 1, en el que la dosis de paclitaxel es de desde 30 mg/m² hasta 1000 mg/m² con un ciclo de dosificación de aproximadamente 3 semanas.

3. El agente para su uso según el punto 1 o el punto 2, en el que el mamífero es un ser humano.

4. El agente para su uso según uno cualquiera de los puntos 1-3, en el que el tumor de mama es un carcinoma de mama.

La divulgación se refiere a un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, en el que el método comprende las etapas de (a) aislar una muestra biológica del mamífero, (b) detectar la expresión de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, y (c) cuantificar la cantidad de proteína SPARC en la muestra biológica. La divulgación se refiere a realizaciones en las que la muestra biológica se aísla del tumor (o tejido implicado con una enfermedad proliferativa) o de un líquido corporal, tal como, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero u orina.

Además, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un tumor u otra enfermedad proliferativa en un mamífero con un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno que comprende (a) aislar una muestra biológica del mamífero, (b) detectar la expresión de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, (c) cuantificar la cantidad de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, (d) determinar si está presente proteína o ARN de SPARC a un nivel que indica el uso del agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, y (e), si, basándose en el nivel de proteína o ARN de SPARC, está indicado, administrar una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno.

Además, la divulgación se refiere a un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, que comprende un medio para el aislamiento de proteína del tumor, un medio de detección y cuantificación de proteína SPARC, proteínas de control y normas para predecir la respuesta del tumor. La divulgación también se refiere a un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, que comprende un medio para el aislamiento de ARN del tumor, un medio de detección y cuantificación de ARN de SPARC, ARN de control y normas para predecir la respuesta del tumor basándose en el nivel de ARN de SPARC en el tumor.

La divulgación se refiere a un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterápico, así como a un método de tratamiento de un tumor de mamífero con un agente quimioterápico, en el que el agente quimioterápico es, por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, tal como Abraxane®, o combinaciones de los mismos. La invención proporciona además realizaciones en las que la predicción de la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterápico se correlaciona de manera positiva o negativa con los niveles de SPARC.

La divulgación se refiere a métodos para predecir o determinar la respuesta de un tumor de mamífero o tratar un tumor de mamífero con un agente quimioterápico, en los que se incluye, por ejemplo sin limitación, en los que el mamífero es un ser humano y el tumor es un carcinoma de mama, ovario, cabeza y cuello, pulmón, colon, vejiga o riñón.

La divulgación se refiere además a un método para usar la proteína de unión a albúmina como agente terapéutico, para usar SPARC y anticuerpos frente a SPARC o proteínas de unión a SPARC como agentes terapéuticos, para administrar 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. Además, la divulgación se refiere a una composición que comprende un agente quimioterápico acoplado a un compuesto que puede unirse a una proteína SPARC y un portador farmacéuticamente aceptable. Además, la invención proporciona un agente de administración 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, la divulgación se refiere a un método para administrar 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 dadas a conocer pueden ser moléculas pequeñas, moléculas grandes o proteínas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de SPARC humana (SEQ ID NO: 1).

La figura 2 representa la secuencia de ADNc de SPARC humana (SEQ ID NO: 2).

La figura 3 ilustra tinción de albúmina y SPARC en xenoinjertos de tumores MX-1.

La figura 4 ilustra la transición de paclitaxel a través de monocapas de células endoteliales.

Las figuras 5A-B ilustran la eficacia comparativa (A, volumen de tumor) y toxicidad (B, % de pérdida de peso) de Abraxane y Taxotere para el tratamiento de un xenoinjerto MX-1.

Las figuras 6A-B ilustran la eficacia comparativa (A, volumen de tumor) y toxicidad (B, % de pérdida de peso) de Abraxane y Taxotere para el tratamiento de un xenoinjerto LX-1.

Las figuras 7A-B ilustran el estado de Her2 y SPARC de los cinco tipos de tumores (A) (SPARC, barra izquierda y Her2, barra derecha en cada par) y la eficacia relativa de Abraxane frente a Taxotere (B).

Las figuras 8A-B ilustran la eficacia comparativa (A, volumen de tumor) y toxicidad (B, % de pérdida de peso) de Abraxane y Taxotere para el tratamiento de un xenoinjerto HT29.

Las figuras 9A-B ilustran la eficacia comparativa (A, volumen de tumor) y toxicidad (B, % de pérdida de peso) de Abraxane y Taxotere para el tratamiento de un xenoinjerto PC3.

Las figuras 10A-B ilustran la eficacia comparativa (A, volumen de tumor) y toxicidad (B, % de pérdida de peso) de Abraxane y Taxotere para el tratamiento de un xenoinjerto MDA-MB-231.

Descripción detallada de la invención

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

proteína de unión a albúmina.

La divulgación se refiere al 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 β , y el agente es un agente terapéutico, de obtención de imágenes o de administración 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 β . Lo más preferido, la proteína de unión a albúmina es 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, moléculas pequeñas, anticuerpos.

La divulgación se refiere a un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor u otra enfermedad proliferativa de seres humanos o de otro mamífero a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno. El método comprende (a) aislar una muestra biológica a partir del ser humano u otro mamífero, (b) detectar la expresión de 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, la eficacia del agente quimioterápico puede predecirse o determinarse, por ejemplo, mediante correlación de la expresión de SPARC con la dosificación de agente terapéutico administrado. La divulgación también se refiere al uso de anticuerpo producido frente a SPARC como agente terapéutico, o un agente de obtención de imágenes para enfermedades en las que SPARC desempeña un papel predominante y se sobreexpresa en relación con tejidos normales.

Por “predecir la respuesta de un tumor de ser humano o de otro mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico” quiere decirse realizar un juicio, basándose en resultados de prueba combinados con experiencia clínica, con respecto a la probabilidad de una respuesta antes de administrar el agente quimioterápico. Por “determinar la respuesta de un tumor de ser humano o de otro mamífero a un agente quimioterápico” quiere decirse realizar un juicio, basándose en resultados de prueba combinados con experiencia clínica, con respecto a la probabilidad de una respuesta después de administrar el agente quimioterápico pero antes de que la respuesta pueda determinarse clínicamente o mediante estudios de laboratorio o de obtención de imágenes convencionales conocidos por los expertos habituales en las técnicas médicas.

Tal como se usa en el presente documento, “la respuesta de un tumor de ser humano o de otro mamífero a un agente quimioterápico” se refiere al grado o la cantidad que el paciente mejora clínicamente o que disminuye de tamaño o agresividad el tumor debido a un agente quimioterápico. Puede decirse que el paciente mejora clínicamente basándose en criterios objetivos, tales como, por ejemplo, estado funcional, examen físico, estudios de obtención de imágenes o resultados de prueba de laboratorio. También puede decirse que el paciente mejora clínicamente basándose en criterios subjetivos comunicados por el paciente, tales como, dolor, malestar, fatiga o estado mental. Las disminuciones del tamaño del tumor pueden basarse en el tumor primario o en la carga global general medida mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, examen físico, estudio de obtención de imágenes o valor de laboratorio. Por “disminución del tamaño del tumor” quiere decirse un cambio de al menos aproximadamente el 10%. Además, es deseable que esté presente un cambio de al menos aproximadamente el 20%, preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 25%, más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 33%, más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 95%, y lo más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 99%. Por disminución de la “agresividad del tumor” quiere decirse, por ejemplo, una reducción del grado histológico, el % de células viables en el tumor, el % de células en proliferación en el tumor, la invasividad del tumor, la capacidad del tumor para metastatizar u otra medida de agresividad del tumor conocida en la técnica. Por “disminución de la agresividad del tumor” quiere decirse un cambio de al menos aproximadamente el 10% en un parámetro medible relacionado con la agresividad del tumor que se usa comúnmente por los expertos habituales en las técnicas médicas. Además, es deseable que esté presente un cambio de al menos aproximadamente el 20%, preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 25%, más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 33%, más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 95%, y lo más preferiblemente un cambio de al menos aproximadamente el 99% en un parámetro medible relacionado con la agresividad del tumor que se usa comúnmente por los expertos habituales en las técnicas médicas.

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

Además, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un tumor u otra enfermedad proliferativa en un

mamífero con un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno que comprende: (a) aislar una muestra biológica del mamífero, (b) detectar la expresión de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, (c) cuantificar la cantidad de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, (d) determinar si está presente proteína o ARN de SPARC a un nivel que indica el uso del agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, y (e), si, basándose en el nivel de proteína o ARN de SPARC, está indicado, administrar una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno.

Los términos “tratar”, “tratamiento”, “terapia” y “tratamiento terapéutico” tal como se usa en el presente documento hacen referencia a terapia curativa, terapia profiláctica o terapia preventiva. Un ejemplo de “terapia preventiva” es la prevención o disminución de la probabilidad de una enfermedad objetivo (por ejemplo, cáncer u otra enfermedad proliferativa) o estado relacionado con el mismo. Las personas que necesitan tratamiento incluyen las personas ya con la enfermedad o el estado así como las personas propensas 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 describen también el manejo y cuidado de un mamífero para el propósito de combatir una enfermedad, o estado relacionado, e incluye la administración de una composición para aliviar los síntomas, efectos secundarios u otras complicaciones de la enfermedad o el estado. El tratamiento terapéutico para el cáncer incluye, pero no se limita a, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia génica e inmunoterapia.

Por “determinar si está presente proteína o ARN de SPARC a un nivel que indica el uso del agente quimioterápico” quiere decirse que el nivel cuantificado de proteína o ARN de SPARC está presente en el espécimen del mamífero con un tumor es suficientemente alto, basándose en una comparación de datos de correlación históricos de nivel de SPARC y respuesta al tratamiento, para indicar que puede esperarse razonablemente que el tumor responda la agente quimioterápico. Por “indicar” o “indicado” quiere decirse que, en vista del nivel de SPARC y basándose en juicio médico razonable, debe usarse el agente quimioterápico. Por ejemplo, sin limitación, puede prepararse una biopsia de un tumor para inmunohistología con anticuerpos anti-SPARC preparando una sección delgada de la biopsia de un portaobjetos de microscopio. Entonces, el portaobjetos de la biopsia se tiñe usando un protocolo inmunohistoquímico anti-SPARC (véase, por ejemplo, Sweetwyne *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 52(6):723-33 (2004); Tai *et al.*, J. Clin. Invest. 115(6): 1492-502 (2005)) simultáneamente con portaobjetos de control que contienen secciones de biopsias con niveles de SPARC conocidos de otros tumores sensibles a y resistentes al agente quimioterápico que se considere usar. Es una práctica común en la técnica clasificar la intensidad de la tinción inmunohistológica usando microscopía óptica. El experto habitual en la técnica (por ejemplo, un histopatólogo) puede, basándose en la comparación con la tinción de los portaobjetos de control, asignar un grado de tinción (por ejemplo, 0, 1+, 2+, 3+, 4+) a la biopsia de tumor. El tratamiento con el agente quimioterápico puede estar “indicado” si la tinción de la biopsia de tumor se clasifica en, por ejemplo, 3+ o 4+. Tales comparaciones y asignaciones de grados de tinción están dentro de la capacidad de un experto médico habitual en la técnica (por ejemplo, físico, histopatólogo, oncólogo, veterinario) que trata mamíferos con tumores.

Por “cantidad terapéuticamente eficaz” quiere decirse una cantidad que alivia (en cierta medida, tal como evalúa un profesional sanitario experto) uno o más síntomas de la enfermedad o el estado en un mamífero. Adicionalmente, por “cantidad terapéuticamente eficaz” quiere decirse una cantidad que devuelve a lo normal parámetros fisiológicos o biológicos, o bien parcial o bien completamente, asociados con o causantes de una enfermedad o un estado. Un experto clínico en la técnica puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición con el fin de tratar o prevenir un estado patológico particular, o un trastorno cuando se administra, tal como por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía oral o a través de inhalación. La cantidad precisa de la composición requerida para ser terapéuticamente eficaz dependerá de numerosos factores, por ejemplo, tales como la actividad específica del agente activo, el dispositivo de administración empleado, las características físicas del agente, el propósito para la administración, además de muchas consideraciones específicas del paciente. La determinación de la cantidad de una composición que debe administrarse para ser terapéuticamente eficaz es rutinaria en la técnica y dentro de la capacidad de un experto clínico habitual.

El agente para su uso según la invención precisa de una muestra biológica que puede aislarse del tumor o tejidos implicados con una enfermedad proliferativa mediante cualquier procedimiento adecuado incluyendo, sin limitación, resección, biopsia, aspiración, venopunción o combinaciones de las mismas. Alternativamente, el agente para su uso según la invención precisa de una muestra biológica que puede proceder de un líquido corporal, tal como, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero y orina. Además, pueden obtenerse muestras biológicas de control o de referencia que incluyen materiales de tumor y de líquidos corporales a partir de tejidos normales del mismo mamífero, a partir de otros individuos que carecen de tumor o enfermedad proliferativa o a partir de otros tumores con niveles de SPARC conocidos y que se sabe que son sensibles a o resistentes a un agente quimioterápico dado. Adicionalmente, el agente puede usarse para un mamífero que padece el tumor o la enfermedad proliferativa que es un ser humano.

Adicionalmente, la divulgación se refiere a un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, que comprende un medio para el aislamiento de proteínas de un tumor, un medio de detección y cuantificación de proteína SPARC, proteínas de control y normas para predecir la respuesta del tumor. La divulgación también se refiere a un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, que comprende un medio para el aislamiento de ARN del tumor, un medio de detección y

cuantificación de ARN de SPARC, ARN de control y normas para predecir la respuesta del tumor basándose en el nivel de ARN de SPARC en el tumor. Por ejemplo, puede “aislarse” la proteína o el ARN de SPARC en una biopsia de tumor situando una sección delgada de la biopsia del tumor en un portaobjetos de microscopio. Cualquier proteína o ARN de SPARC presente puede detectarse y cuantificarse mediante tinción inmunohistológica con un anticuerpo anti-SPARC (véase, por ejemplo, Sweetwyne *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 52(6):723-33 (2004); Tai *et al.*, J. Clin. Invest. 115(6): 1492-502 (2005)) o hibridación *in situ* usando una sonda de ácido nucleico complementaria al ARN de SPARC (véase, por ejemplo, Thomas *et al.*, Clin. Can. Res. 6:1140-49 (2000)). Se tefirán al mismo tiempo portaobjetos de control positivo y negativo para proteína o ARN de SPARC. El experto habitual en la técnica puede usar fácilmente microscopía óptica para clasificar la intensidad de tinción de SPARC en la biopsia de tumor (por ejemplo, 0, 1+, 2+, 3+, 4+). El kit de la invención también comprende normas para predecir la respuesta del tumor basándose en el nivel de proteína o ARN de SPARC en el tumor, tal como, por ejemplo, “el tratamiento con el agente quimioterápico está indicado si la tinción de la biopsia de tumor se clasifica a, por ejemplo, 3+ o 4+” o “los tumores con tinción 3+ o 4+ tienen una alta tasa de respuesta”. Las normas específicas que se refieren a una realización particular de los kits de la invención pueden generarse fácilmente llevando a cabo estudios de correlación retrospectivos o prospectivos que son rutinarios en la técnica y que no requerirán excesiva experimentación.

El gen de SPARC humano codifica para una proteína SPARC de 303 aminoácidos, mientras que la SPARC madura es una glicoproteína de 285 aminoácidos. Después de la escisión de la secuencia señal se produce una forma secretada de 32 kD que migra a 43 kD en SDS-PAGE debido a la glicosilación. La secuencia de aminoácidos de la proteína SPARC completa se da a conocer en la SEQ ID NO: 1 (figura 1) y la secuencia de ácido nucleico de un ARN que codifica para una proteína SPARC de ese tipo se da a conocer en la SEQ ID NO: 2 (presentada como una secuencia de ADNc, es decir, con las uridinas (“U”) del ARN como timinas (“T”)) (figura 2).

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente. La divulgación se refiere a la detección y cuantificación de un polipéptido o una proteína SPARC tal como, por ejemplo, un polipéptido o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La divulgación también se refiere a la detección de un polipéptido SPARC, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 10 aminoácidos secuenciales a partir de la secuencia de SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos aproximadamente 15 aminoácidos secuenciales a partir de la secuencia de SEQ ID NO: 1, más preferiblemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos secuenciales a partir de la secuencia de SEQ ID NO: 1, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos secuenciales a partir de la secuencia de SEQ ID NO: 1. Además, la divulgación se refiere a la detección de un polipéptido SPARC que comprende un polipéptido en el que la secuencia es homóloga en al menos aproximadamente el 80% con la secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 1, preferiblemente homóloga en al menos aproximadamente el 90% con la secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 1, incluso más preferiblemente homóloga en al menos aproximadamente el 95% con la secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 1, e incluso más preferiblemente homóloga en al menos aproximadamente el 99% con la secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 1. Por “secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 1” quiere decirse la secuencia que se alinea con la secuencia de SEQ ID NO: 1 en la que la región de alineación tiene al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente tiene al menos aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, e incluso más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. Se conocen diversos métodos de alineación de secuencias en las técnicas biotecnológicas (véanse, por ejemplo, Rosenberg, BMC Bioinformatics 6:278 (2005); Altschul *et al.*, FEBS J. 272(20): 5101-5109 (2005)).

La divulgación se refiere a la detección y cuantificación de un ARN de SPARC de ese tipo, por ejemplo, un ARN que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2. La invención también proporciona la detección de ARN de SPARC, en el que el ARN comprende la secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 15 nucleótidos secuenciales de la secuencia de SEQ ID NO: 2, preferiblemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos secuenciales de la secuencia de SEQ ID NO: 2, y más preferiblemente al menos aproximadamente 30 nucleótidos secuenciales de la secuencia de SEQ ID NO: 2. Además, la divulgación se refiere a la detección de un ARN de SPARC que comprende un ácido nucleico en el que la secuencia es homóloga en al menos aproximadamente el 80% con la secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 2, preferiblemente homóloga en al menos aproximadamente el 90% con la secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 2, incluso más preferiblemente homóloga en al menos aproximadamente el 95% con la secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 2 e incluso más preferiblemente homóloga en al menos aproximadamente el 99% con la secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 2. Por “secuencia correspondiente de SEQ ID NO: 2” quiere decirse la secuencia que se alinea con la secuencia de SEQ ID NO: 2 en la que la región de alineación tiene al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, preferiblemente tiene al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, incluso más preferiblemente tiene al menos aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Se conocen diversos métodos de alineación de secuencias en las

técnicas biotecnológicas (véanse, por ejemplo, Rosenberg, BMC Bioinformatics 6:278 (2005); Altschul *et al.*, FEBS J. 272(20): 5101-5109 (2005)). Por ARN de SPARC quiere decirse ARN de SPARC, incluyendo, pero sin limitarse a, ARNm de SPARC, ARNhn, transcrito primario o variante de corte y empalme.

Por “cuantificación” tal como se usa en el presente documento quiere decirse determinar la cantidad o concentración presente. La divulgación se refiere a un método de cuantificación del nivel de proteína o ARN de SPARC en el que se sobreexpresa o subexpresa proteína o ARN de SPARC en el tumor en relación con tejidos normales, incluyendo, pero sin limitarse a, el nivel hallado en el tejido normal correspondiente de origen del tumor. Alternativamente, la divulgación se refiere a un método de cuantificación del nivel de proteína o ARN de SPARC en el que se sobreexpresa o subexpresa proteína o ARN de SPARC en el tumor en relación con otros tumores, incluyendo pero sin limitarse a, tumores del mismo tejido o histología. Además, la divulgación se refiere a un método de cuantificación del nivel de proteína o ARN de SPARC en el que se sobreexpresa o subexpresa proteína o ARN de SPARC en el tumor en relación con otros tumores, incluyendo, pero sin limitarse a, tumores que son sensibles a o resistentes a un agente quimioterápico o una combinación de agentes quimioterápicos. Por se sobreexpresa o subexpresa quiere decirse que los niveles de proteína o ARN de SPARC difieren entre los dos especímenes o muestras en al menos aproximadamente el 5%. Además, es deseable que la diferencia entre los dos especímenes o muestras sea de al menos aproximadamente el 10%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 100%, más preferiblemente al menos aproximadamente 3 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 veces, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces.

La divulgación se refiere a un método de cuantificación del nivel de proteína o ARN de SPARC en el que se sobreexpresa o subexpresa proteína o ARN de SPARC en el líquido biológico de prueba en relación con el líquido correspondiente de un paciente que carece de tumores. Alternativamente, la divulgación se refiere a un método de cuantificación del nivel de proteína o ARN de SPARC en el que se sobreexpresa o subexpresa proteína o ARN de SPARC en el líquido biológico de prueba en relación con el líquido correspondiente de otro paciente con un tumor, incluyendo pero sin limitarse a, tumores que son sensibles a o resistentes a un agente quimioterápico o una combinación de agentes quimioterápicos. Por se sobreexpresa o subexpresa quiere decirse que los niveles de proteína o ARN de SPARC difieren en dos especímenes en al menos aproximadamente el 5%. Además, es deseable que esté presente una diferencia de al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente en al menos aproximadamente el 100%, más preferiblemente al menos aproximadamente 3 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 veces, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces.

La divulgación se refiere a métodos de predicción o determinación de la respuesta de un tumor a un agente quimioterápico u otros agentes anticancerígenos, métodos de tratamiento de un tumor, y kits para predecir la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, en el que el tumor se selecciona del grupo que consiste en tumores de la cavidad bucal, tumores faríngeos, tumores del sistema digestivo, tumores del sistema respiratorio, tumores óseos, tumores cartilaginosos, metástasis óseas, sarcomas, tumores de piel, melanoma, tumores de mama, los tumores del aparato genital, tumores de las vías urinarias, tumores orbitales, tumores cerebrales y del sistema nervioso central, gliomas, tumores del sistema endocrino, tumores de tiroides, tumores esofágicos, tumores gástricos, tumores del intestino delgado, tumores de colon, tumores rectales, tumores anales, tumores hepáticos, tumores de vesícula biliar, tumores pancreáticos, tumores de laringe, tumores de pulmón, tumores bronquiales, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de pulmón de células pequeñas, tumores cervicouterinos, tumores de cuerpo uterino, tumores de ovario, tumores vulvares, tumores vaginales, tumores de próstata, carcinoma prostático, tumores testiculares, tumores del pene, tumores de vejiga urinaria, tumores del riñón, tumores de la pelvis renal, tumores del uréter, 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. Además, la divulgación se refiere a un método de predicción o determinación de la respuesta de un tumor a un agente quimioterápico, métodos de tratamiento de un tumor, y kits para predecir la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterápico, en el que el tumor es un sarcoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células basales, carcinoma de células claras, oncocitoma o combinaciones de los mismos. Además, la divulgación se refiere a un método de predicción o determinación de la respuesta de un tumor a un agente quimioterápico, métodos de tratamiento de un tumor, y kits para predecir la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterápico, en el que el tumor es un tumor benigno o un tumor maligno. Todavía más, la divulgación se refiere a un método de predicción o determinación de la respuesta de una enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico o de tratamiento de una enfermedad proliferativa, incluyendo, pero sin limitarse a, cuando la enfermedad proliferativa es, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, endometriosis, hiperplasia endometrial, aterosclerosis, psoriasis o una glomerulopatía renal proliferativa. La divulgación se refiere a realizaciones en las que el tumor o la enfermedad proliferativa es en un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, cuando el mamífero es un ser humano.

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 compuesto por materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos de animales (particularmente de mamíferos) que se sospecha que tienen propiedades terapéuticas. El agente o fármaco puede purificarse,

purificarse sustancialmente o purificarse parcialmente. Un “agente”, según la presente divulgación, incluye además un agente de radioterapia. Tal como se usa en el presente documento, el término “agente quimioterápico” se refiere a un agente con actividad contra enfermedades de cáncer, neoplásicas y/o proliferativas.

Los agentes quimioterápicos u otros agentes anticancerígenos adecuados para su uso según la divulgación incluyen pero no se limitan a, inhibidores de tirosina cinasa (genisteína), agentes biológicamente activos (TNF, de tTF), radionúclidos (^{131}I , ^{90}Y , ^{111}In , ^{211}At , ^{32}P y otros radionúclidos terapéuticos conocidos), adriamicina, antibióticos de ansamicina, asparaginasa, bleomicina, busulfano, cisplatino, carboplatino, carmustina, capecitabina, clorambucilo, citarabina, ciclofosfamida, camptotecina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, dextrazoxano, docetaxel, doxorubicina, etopósido, epotilonas, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, mercaptopurina, melfalán, metotrexato, rapamicina (sirolimús) y derivados, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nitrosourea, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, estreptozocina, tenipósido, tioguanina, tiotepa, taxanos, vinblastina, vincristina, vinorelbina, taxol, combretastatinas, discodermolidas y transplatino. Por consiguiente, los agentes quimioterápicos adecuados para su uso según la divulgación incluyen, sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, asparaginasa), antimitóticos (por ejemplo, alcaloides de la vinca), agentes que dañan el ADN (por ejemplo, cisplatino), proapoptóticos (agentes que inducen muerte celular programada o apoptosis) (por ejemplo, epipodofilotoxinas), agentes inductores de diferenciación (por ejemplo, retinoides), antibióticos (por ejemplo, bleomicina) y hormonas (por ejemplo, tamoxifeno, dietilestilbestrol). Además, los agentes quimioterápicos adecuados para su uso según la divulgación incluyen agentes antiangiogénesis (inhibidores de la angiogénesis) tales como, por ejemplo, INF-alfa, fumagilina, angiostatina, endostatina, talidomida y similares. “Otros agentes anticancerígenos” también incluyen, sin limitación, polipéptidos biológicamente activos, anticuerpos, lectinas y toxinas. Los anticuerpos adecuados para su uso según la divulgación incluyen, sin limitación, anticuerpos conjugados (acoplados) o no conjugados (no acoplados), anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos humanizados o no humanizados, así como fragmentos Fab', Fab o Fab2, anticuerpos de cadena sencilla y similares.

Los agentes quimioterápicos preferidos incluyen docetaxel, paclitaxel y combinaciones de los mismos. “Combinaciones de los mismos” se refiere tanto a la administración de formas de dosificación que incluyen más de un fármaco, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel, así como a la administración secuencial, pero temporalmente separada de docetaxel y paclitaxel (por ejemplo, el uso de docetaxel en un ciclo y de paclitaxel en el siguiente). Agentes quimioterápicos particularmente preferidos comprenden partículas de proteína unida a fármaco, incluyendo pero sin limitarse a, en los que la proteína que constituye las partículas de proteína unida a fármaco comprende albúmina incluyendo en los que más del 50% del agente quimioterápico está en forma de nanopartícula. Lo más preferiblemente, el agente quimioterápico comprende partículas de paclitaxel unido a albúmina, tal como, por ejemplo, Abraxane®. Tales formulaciones de paclitaxel unido a albúmina pueden usarse según la invención donde la dosis de paclitaxel administrada es de desde aproximadamente 30 mg/m² hasta aproximadamente 1000 mg/m² con un ciclo de dosificación de aproximadamente 3 semanas (es decir, administración de la dosis de paclitaxel una vez cada aproximadamente tres semanas). Adicionalmente, es deseable que la dosis de paclitaxel administrada sea de desde aproximadamente 50 mg/m² hasta aproximadamente 800 mg/m², preferiblemente de desde aproximadamente 80 mg/m² hasta aproximadamente 700 mg/m², y lo más preferiblemente de desde aproximadamente 250 mg/m² hasta aproximadamente 300 mg/m² con un ciclo de dosificación de aproximadamente 3 semanas.

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

Puede usarse cualquier método adecuado para la detección y cuantificación de una proteína SPARC según la divulgación incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de anticuerpos anti-SPARC (por ejemplo, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA) (véase, por ejemplo, Sweetwyne *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 52(6):723-33 (2004); Tai *et al.*, *J. Clin. Invest.* 115(6): 1492-502 (2005)), el uso de proteínas de unión específicas de SPARC (por ejemplo, ligandos de SPARC radiomarcados, ensayos similares a ELISA), electroforesis bidimensional, espectroscopía de masas o combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Nedelkov D *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(31):10852-7 (2005); Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(49): 17039-44(2004)). Adicionalmente, puede usarse inmunohistoquímica para el aislamiento, la detección y la cuantificación de proteína SPARC en una muestra (véase, por ejemplo, Sweetwyne *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 52(6):723-33 (2004); Tai *et al.*, *J. Clin. Invest.* 115(6):1492-502 (2005)).

La divulgación se refiere a un método en el que se detecta y se cuantifica el ARN de SPARC. Se conocen en la técnica numerosos métodos para aislar ARN, tal como los descritos por Chomczynski (patente estadounidense n.º 5.945.515) o por DiMartino *et al.* (*Leukemia* 20(3):426-32 (2006)). Alternativamente, el ARN puede aislarse en una forma adecuada para la detección y cuantificación según la invención mediante la preparación de un portaobjetos de microscopio que contiene un corte tisular (véase, por ejemplo, Thomas *et al.*, *Clin. Can. Res.* 6:1140-49 (2000)). El ARN de SPARC puede detectarse y cuantificarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Thomas *et al.*, *Clin. Can. Res.* 6:1140-49

(2000)), transferencia de tipo Northern (véase por ejemplo, Wrana *et al.*, Eur. J. Biochem. 197:519-28 (1991)), RT-PCR en tiempo real (véase, por ejemplo, DiMartino *et al.*, Leukemia 20(3):426-32 (2006)), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico en tiempo real (véase, por ejemplo, Landry *et al.*, J. Clin. Microbiol. 43(7):3136-9 (2005)), análisis de microalineamiento (véase, por ejemplo, Tai *et al.*, J. Clin. Invest. 115(6): 1492-502 (2005); DiMartino *et al.*, Leukemia 20(3):426-32 (2006)) y combinaciones de los mismos.

La divulgación también se refiere a un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otros agentes anticancerígenos en el que la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterápico se correlaciona de manera positiva o negativa con niveles de SPARC. Por "correlacionado con niveles de SPARC" quiere decirse, por ejemplo, una relación mutua o recíproca entre la respuesta del tumor a un agente quimioterápico dado y el nivel de proteína o ARN de SPARC detectado. Es decir, la calidad, el grado, la magnitud o el nivel de la respuesta tumoral varía con el nivel de proteína o ARN de SPARC detectado. Una "correlación positiva" está presente cuando la calidad, el grado, la magnitud o el nivel de la respuesta tumoral aumentan a medida que aumenta el nivel de proteína o ARN de SPARC detectado. Una "correlación negativa" está presente cuando la calidad, el grado, la magnitud o el nivel de la respuesta tumoral disminuyen a medida que el nivel de proteína o ARN de SPARC detectado aumenta. La relación entre el nivel de la respuesta tumoral y el nivel de proteína o ARN de SPARC detectado puede adoptar la forma de o aproximarse a una función escalonada, función lineal o función logarítmica.

Además, la divulgación también se refiere a un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otros agentes anticancerígenos comparando el nivel de proteína o ARN de SPARC detectado con el detectado en una muestra de referencia conocida. Una muestra de referencia de este tipo puede proceder de, por ejemplo, un tejido o líquido corporal normal. Alternativamente, la muestra de referencia puede ser un tumor con un nivel de SPARC, respuesta, sensibilidad o resistencia conocidos a un agente quimioterápico dado u otros agentes anticancerígenos o combinaciones de los mismos.

Adicionalmente, la respuesta predicha puede caracterizarse como eficaz o como no eficaz de manera que se usará un agente quimioterápico dado o se usará un agente quimioterápico alternativo. Como tal, la respuesta predicha puede caracterizarse como una razón de la respuesta que resulta del uso de un agente quimioterápico frente al uso de otro agente quimioterápico, por ejemplo, la razón de la respuesta producida por Abraxane® frente a la producida por Taxotere®.

La divulgación se refiere además a métodos de predicción de la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno que comprende (a) aislar una muestra biológica del mamífero, (b) detectar la expresión de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, (c) cuantificar la cantidad de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, y (d) determinar el estado de Her2 del tumor o enfermedad proliferativa. La divulgación también se refiere a métodos de tratamiento de un tumor u otra enfermedad proliferativa en un mamífero con un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno que comprende: (a) aislar una muestra biológica del mamífero, (b) detectar la expresión de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, (c) cuantificar la cantidad de proteína o ARN de SPARC en la muestra biológica, (d) determinar el estado de Her2 del tumor o enfermedad proliferativa, (e) determinar si, basándose en el nivel de proteína o ARN de SPARC presente y el estado de Her2 del tumor o enfermedad proliferativa, si está indicado el uso del agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno, y (f), si está indicado, administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno.

Por "determinar el estado de Her2 del tumor o enfermedad proliferativa" quiere decirse determinar si el tumor u otra enfermedad proliferativa expresa o no la proteína o ARN de Her2 mediante la detección de la expresión de la proteína o ARN de Her2 en el tumor, tejido implicado por otra enfermedad proliferativa u otra muestra biológica y cuantificar la cantidad de proteína o ARN de Her2 presente. Los métodos adecuados para determinar si un tumor o enfermedad proliferativa expresa proteína o ARN de Her2 incluyen, sin limitación, inmunohistoquímica, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, electroforesis bidimensional, espectroscopía de masas, hibridación *in situ*, amplificación de ARN, transferencia de tipo Northern, análisis de microalineamiento o combinaciones de los mismos. El estado de Her2 puede ser un factor en la predicción de una respuesta a un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno o en la determinación de si un agente quimioterápico u otro agente anticancerígeno está indicado o bien positivamente o bien negativamente, como factor de adición o como factor predominante. Por ejemplo, sin limitación, la ausencia de expresión de Her2 puede indicar que no hay correlación positiva entre el nivel de SPARC y la respuesta, mientras que la presencia de expresión de Her2 puede indicar que hay una correlación positiva entre el nivel de SPARC y la respuesta. La distinción entre la expresión de Her2 y su ausencia está dentro de la capacidad de los expertos habituales en la técnica y puede realizarse basándose, por ejemplo, en los resultados de muestras de control positivas y negativas obtenidos simultáneamente con las muestras del mamífero con el tumor u otra enfermedad proliferativa.

Por consiguiente, la divulgación se refiere a un kit para predecir la respuesta de un tumor de mamífero u otra enfermedad proliferativa a un agente quimioterápico u otros agentes anticancerígenos, que comprende un medio para el aislamiento de proteínas o ARN del tumor, un medio de detección o cuantificación de proteína o ARN de SPARC, proteínas o ARN de control, y normas para predecir la respuesta del tumor. Un kit de este tipo puede

usarse, por ejemplo sin limitación, para predecir la respuesta de un carcinoma de mama, ovario o cabeza y cuello a un agente quimioterápico que comprende nanopartículas de paclitaxel unido a albúmina. En el presente documento se han descrito medios adecuados para aislar proteína o ARN y una detección y cuantificación de proteína o ARN de SPARC. Las proteínas o ARN de control deben incluir controles positivos tales como, por ejemplo, material tumoral o líquido biológico de un mamífero que porta un tumor o proteína o ARN aislado de material tumoral o de un líquido biológico recogido de un mamífero que porta un tumor. Las proteínas o ARN de control adecuados incluyen controles negativos tales como, por ejemplo, tejido o líquido biológico normal de un mamífero libre de tumor o proteína o ARN aislado de tejido o líquido biológico normal recogido de un mamífero libre de tumor. Los controles en el kit también pueden incluir materiales usados para establecer curvas patrón para la cuantificación de proteína o ARN de SPARC o material de tumores sensibles y resistentes. Los kits de la divulgación también pueden comprender un medio para determinar el estado de Her2 del tumor.

Los kits comprenderán adicionalmente normas para predecir la respuesta del tumor. Tales normas se basarán en la predicción de la respuesta a un agente quimioterápico dado en el nivel de proteína o ARN de SPARC detectado tal como se describe en el presente documento en relación con los métodos de predicción o determinación de una respuesta al agente quimioterápico. Por ejemplo, un nivel particular de proteína o ARN de SPARC, basándose en la experiencia pasada, puede indicar que debe usarse un agente quimioterápico. Está dentro de la capacidad del experto habitual en la técnica generar, sin experimentación excesiva, datos adecuados (mediante estudios prospectivos, estudios retrospectivos una combinación de los mismos) para determinar el nivel de proteína o ARN de SPARC predictivo de la respuesta a un agente quimioterápico dado.

A continuación en el presente documento, por motivos de 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 determinados tumores humanos. Dado que la albúmina es el principal portador de los 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.

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

Puede usarse cualquier agente farmacéuticamente activo adecuado (por ejemplo, un agente quimioterápico acoplado a un grupo de reconocimiento de SPARC), siempre que el transporte o la unión del agente activo requiera albúmina. Los agentes activos adecuados incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de tirosina cinasa (genisteína), agentes biológicamente activos (TNF o tTF), radionúclidos (por ejemplo, ^{131}I , ^{90}Y , ^{111}In , ^{211}At , ^{32}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, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, mercaptopurina, melfalán, metotrexato, rapamicina (sirolímús) y derivados, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nitrosurea, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, estreptozocina, tenipósido, tioguanina, tiotepa, taxanos, vinblastina, vincristina, vinorelbina, taxol, combretastatinas, discodermolida y transplatino, factores 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.

Además, el agente farmacéuticamente activo puede ser toxinas tales como ricino A, radionúclidos, el fragmento Fc del propio anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, diacuerpos, y similares. Los agentes farmacéuticamente activos seleccionados de los mismos pueden reconocer y unirse a SPARC o pueden unirse de manera adecuada a un grupo de reconocimiento de SPARC que reconoce SPARC, incluyendo por ejemplo, una proteína o molécula distinta de proteína, un anticuerpo, fragmento Fc del propio anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, diacuerpos, péptidos, u otras moléculas pequeñas distintas de proteínas.

Pueden administrarse una o más dosis de uno o más agentes quimioterápicos. El tipo y el número de agentes quimioterápicos usados en el método dependerá del régimen quimioterápico convencional para un tipo de tumor particular. En otras palabras, aunque un cáncer particular puede tratarse de manera rutinaria con un solo 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, agentes quimioterápicos, radionúclidos, etc. adecuados a anticuerpos o fragmentos de los mismos están bien descritos en la técnica.

Las enfermedades para las que es útil la presente divulgación incluyen estados de proliferación anómalos, remodelación tisular, hiperplasia, cicatrización de heridas exagerada en cualquier tejido corporal incluyendo tejido blando, tejido conjuntivo, hueso, órganos sólidos, vasos sanguíneos y similares. Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse o diagnosticarse mediante composiciones dadas a conocer en el presente documento incluyen

cáncer, retinopatía diabética u otra, inflamación, artritis, reestenosis en vasos sanguíneos o injertos artificiales de vasos sanguíneos o dispositivos intravasculares y similares.

Los tipos de tumor que van a detectarse, cuya respuesta a quimioterapia va a predecirse o determinarse, que pueden tratarse según la divulgación son generalmente los encontrados en seres humanos y otros mamíferos. Los tumores también pueden ser el resultado de inoculación, tal como en animales de laboratorio. Se encuentran muchos tipos y formas de tumores en estados de seres humanos y otros animales, y no se pretende limitar la aplicación de los métodos de la presente a ningún tipo o variedad de tumor particular. Los tumores, tal como se conoce, incluyen una masa de tejido anómala que resulta de división celular no controlada y progresiva y conocida también normalmente como "neoplasia". Los métodos son útiles para células tumorales y células estromales 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 bucal y la faringe, el sistema digestivo, el sistema respiratorio, huesos y articulaciones (por ejemplo, metástasis de huesos), 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 a tumor o cáncer primario. Los tejidos asociados con la cavidad bucal incluyen, pero no se limitan a, la lengua y tejidos de la boca. Puede surgir cáncer 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 los bronquios e incluyen, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas. Pueden surgir tumores en el cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, vulva, vagina, próstata, testículos y pene, que constituyen los sistemas genitales masculino y femenino, y en la vejiga urinaria, riñón, pelvis renal y uréter, que comprenden el sistema urinario. El tumor o cáncer puede estar ubicado en la cabeza y/o el cuello (por ejemplo, cáncer de laringe y cáncer paratiroideo). El tumor o cáncer también puede estar ubicado en el sistema hematopoyético o el sistema linfático, e incluyen, por ejemplo, linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), mieloma múltiple o leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena 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 para administrar un agente terapéutico a un sitio de enfermedad se basa en el descubrimiento de que pueden usarse compuestos o ligandos, incluyendo albúmina, que tienen afinidad por SPARC para administrar fármacos terapéuticos al sitio de enfermedad, con poca o ninguna administración a tejidos normales.

La divulgación también se refiere a medios de transporte de la composición terapéutica a través de la barrera endotelial de vasos sanguíneos al interior del intersticio tumoral. El principal obstáculo en la terapia con anticuerpos y la quimioterapia es la translocación a través de la barrera endotelial al interior del intersticio tumoral. La albúmina utiliza el mecanismo de transporte del receptor de albúmina para atravesar la barrera endotelial. Este mecanismo de transporte podría ser el mismo que los notificados por la bibliografía (gp60 y albondina) o mediante otros mecanismos no descubiertos. Se ha notificado previamente que el agente terapéutico portado sobre la albúmina mostró 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®, 2th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) (2004), abstract n.º 1071). Además, puede lograrse la translocación potenciada a través de la barrera endotelial 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 la albúmina. Para formulaciones de moléculas pequeñas, puede retirarse un disolvente que impide la unión del fármaco a la 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 por ingeniería genética los compuestos biológicos con un péptido de unión a albúmina de manera que los compuestos biológicos mostrarán afinidad por albúmina. El péptido puede ser o bien una secuencia de unión de albúmina, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra albúmina, anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra portadores de albúmina (tales como receptor gp60/albondina/eliminador o receptor de TGF-beta), o anticuerpo frente a cualquiera de las proteínas encontradas en las caveolas, el transportador de albúmina. La divulgación también contempla un anticuerpo o fragmento adecuado del mismo preparado como quimera con una valencia para SPARC y otra valencia para un efector del transporte transendotelial tal como receptor gp60/albondina/eliminador o receptor de TGF-beta, o contra cualquiera de las proteínas encontradas en las caveolas de la célula endotelial.

La divulgación también se refiere a un método para la destrucción de tejidos de expresión de SPARC tales como tejidos tumorales y reestenóticos a través de fijación del complemento y/o reclutamiento de células mediados por la respuesta inmunitaria mediante anticuerpos frente a SPARC. En este caso, al igual que Rituxan, un anticuerpo anti-CD20, el resto efector es el fragmento Fc que puede mediar o bien la activación del complemento con destrucción directa de células de expresión de SPARC o bien el reclutamiento de células inmunitarias para el tejido de expresión de SPARC con destrucción tisular resultante a través de la respuesta inmunitaria mediada por células.

La divulgación también se refiere a un método para la inhibición de la actividad de SPARC usando un anticuerpo neutralizante contra SPARC. El anticuerpo neutralizante tiene la capacidad de bloquear la interacción de SPARC con sus efectores *in vivo*. Por ejemplo, el anticuerpo neutralizante puede bloquear la interacción de 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+} .

La divulgación también se refiere a un método para determinar la respuesta de un tumor humano o de otro mamífero a terapia anti-SPARC. El método comprende (a) aislar una muestra biológica del ser humano, (b) detectar la expresión de proteína SPARC en la muestra biológica, y (e) cuantificar la cantidad de proteína SPARC en la muestra biológica. Dado que la terapia anti-SPARC se basa en la unión del anticuerpo frente a SPARC a SPARC en tejido enfermo, es necesaria la presencia de SPARC en tejido enfermo para su actividad.

La divulgación se refiere además a un método de uso de uno o más agentes de diagnóstico conjugados con 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 contraste de IRM, agentes de contraste de rayos X, agentes de contraste de ultrasonidos y agentes de contraste de PET. Se conocen en la técnica métodos utilizados para conjugación.

La expresión de 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 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 en la absorbancia en azul de Coomassie G-250 tras la unión a proteínas. La biopsia de tumor puede analizarse mediante cualquiera de los métodos anteriores o puede analizarse mediante inmunohistoquímica usando anticuerpo anti-SPARC (o bien monoclonal o bien policlonal) conjuntamente con un sistema de visualización apropiado (es decir, sustrato de HRP y anticuerpo secundario conjugado con HRP).

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

Para el uso humano, con el fin de evitar la inmunogenicidad y la respuesta inmunitaria, es preferible usar un anticuerpo humanizado anti-SPARC 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) puede construirse un anticuerpo humanizado usando una estructura principal de IgG humana que reemplaza a la región CDR variable con la del anticuerpo contra SPARC, donde las cadenas pesadas y ligeras se expresan independientemente con promotores independientes o se coexpresan con un promotor con secuencia IRES; 2) puede producirse un anticuerpo humanizado monoclonal contra SPARC usando un ratón modificado por ingeniería genética para que tenga un sistema inmunitario humano; 3) puede producirse un anticuerpo humanizado contra SPARC usando un fagémido (M13, colifago lambda, o cualquier sistema de fago que pueda presentar en superficie). Para construir el anticuerpo de longitud completa, la región variable puede transferirse sobre la CDR tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. La coexpresión de la cadena pesada y la cadena ligera en células de mamífero tales como CHO, 293, o células mielógenas humanas da como resultado el anticuerpo de longitud completa. De manera similar, pueden prepararse los fragmentos Fab', Fab, o Fab2 y anticuerpos de cadena sencilla usando métodos bien establecidos.

El anticuerpo contra SPARC tampoco se limita al anticuerpo completo o al fragmento del anticuerpo que conserva el sitio de unión para SPARC (por ejemplo, Fab y Fab2). El anticuerpo tampoco se limita a cualquiera de una clase de anticuerpo, por ejemplo, IgM, IgA, IgG, IgE, IgD e IgY. El anticuerpo tampoco se limita a 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. Pueden usarse las mismas tecnologías para generar el resto de clases de anticuerpos tales como IgE, IgA, IgD, IgM, teniendo cada una actividades diferentes de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) apropiadas para una diana de enfermedad particular. Pueden generarse fragmentos funcionales del anticuerpo mediante proteólisis limitada.

Estos fragmentos pueden ser monovalentes tal como Fab' o divalentes, tal como Fab2. También pueden sintetizarse fragmentos como scfv de cadena sencilla o diacuerpos en *E. coli*.

La divulgación se refiere además a 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 resto de unión a albúmina, y un portador farmacéuticamente aceptable. El agente de administración, que puede ser una composición farmacéutica, que comprende el agente farmacéuticamente activo acoplado a un grupo de reconocimiento de SPARC, se administra a un mamífero, tal como un ser humano, en una cantidad de manera que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del agente farmacéuticamente activo al mamífero.

La divulgación se refiere además a un método para administrar 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 componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones dadas a conocer en el presente documento también son aplicables a los mismos aspectos del método mencionado anteriormente de administrar un agente quimioterápico a un tumor.

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 nada del agente terapéutico en forma de nanopartícula.

La divulgación también se refiere a un método para administrar un agente quimioterápico a un tumor en un ser humano o otro mamífero. El método comprende administrar a un ser humano u otro mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de administración, tal como una composición farmacéutica, en el que el agente de administración (por ejemplo, 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 una 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 componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones dadas a conocer en el presente documento también son aplicables a los mismos aspectos del método mencionado anteriormente de administrar un agente quimioterápico a un tumor.

La divulgación se refiere a un método para administrar un agente farmacéuticamente activo mediante un grupo de reconocimiento de SPARC a un sitio de enfermedad que se caracteriza por sobreexpresión de SPARC u otro marcador o proteína de unión a albúmina en un ser humano, u otro animal que expresa tal marcador o proteína. Tales enfermedades incluyen estados de proliferación anómalos, remodelación tisular, hiperplasia y cicatrización de heridas exagerada en tejido corporal (por ejemplo, tejido blando, tejido conjuntivo, hueso, órganos sólidos, vasos sanguíneos y similares). Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse o pueden diagnosticarse mediante la administración de 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 artificiales de vasos sanguíneos, o dispositivos intravasculares, y similares. Las descripciones del agente farmacéuticamente activo, el tumor, el mamífero y componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones dadas a conocer en el presente documento también son aplicables a los mismos aspectos del método mencionado anteriormente de administrar un agente farmacéuticamente activo.

La divulgación se refiere a un método para administrar un agente farmacéuticamente activo (por ejemplo, anticuerpo frente a SPARC solo o agente quimioterápico conjugado con 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 sobreexpresión de SPARC en un ser humano, u otro animal que expresa tal marcador o proteína. Tales enfermedades incluyen estados de proliferación anómalos, remodelación tisular, hiperplasia y cicatrización de heridas exagerada en tejido corporal (por ejemplo, tejido blando, tejido conjuntivo, hueso, órganos sólidos, vasos sanguíneos y similares). Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse o diagnosticarse mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende terapia anti-SPARC, incluyen cáncer, retinopatía diabética u otra, inflamación, artritis, reestenosis en vasos sanguíneos, injertos artificiales de vasos sanguíneos o dispositivos intravasculares, y similares. Las descripciones del agente farmacéuticamente activo, el tumor, el mamífero y componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones dadas a conocer en el presente documento también son aplicables a los mismos aspectos del método mencionado anteriormente de administrar un agente farmacéuticamente activo.

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 proteína SPARC. El agente quimioterápico puede acoplarse al compuesto o ligando que puede unirse a proteína SPARC usando cualquier método adecuado. Preferiblemente, el agente quimioterápico se acopla químicamente al compuesto a través de enlaces covalentes incluyendo, por ejemplo, enlaces disulfuro.

La divulgación se refiere a 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 a través de enlaces covalentes incluyendo, por ejemplo, enlaces disulfuro.

Preferiblemente, el compuesto o ligando puede unirse a la proteína SPARC. En una realización preferida, el compuesto es un ligando que se une a una proteína SPARC. Los ejemplos de ligandos adecuados incluyen catión calcio (Ca^{2+}), catión cobre (Cu^{2+}), catión hierro (Fe^{2+}), factor 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 hidroxiapatita. Preferiblemente, 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 compuesto químico (por ejemplo, un compuesto químico orgánico o inorgánico), un péptido, o mimético de péptido, una proteína o un hidrato de carbono. Preferiblemente, el compuesto es un anticuerpo que se dirige contra una proteína SPARC. En el método puede usarse cualquier anticuerpo adecuado, o fragmento del mismo, que se une a una proteína SPARC.

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

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

La divulgación también se refiere a un método para administrar 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 componentes de los mismos, expuestos en el presente documento en relación con otras realizaciones también son aplicables a los mismos aspectos del método mencionado anteriormente de administrar 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 para dar una composición farmacéutica que comprende un portador fisiológicamente aceptable. Puede usarse cualquier portador fisiológicamente aceptable adecuado, y tales portadores se conocen bien en la técnica.

Para su uso *in vivo*, el agente de terapia anti-SPARC se formula de manera deseable para dar una composición farmacéutica que comprende un portador fisiológicamente aceptable. Puede usarse cualquier portador fisiológicamente aceptable adecuado, y tales portadores se conocen bien en la técnica.

El portador normalmente será líquido, pero también puede ser sólido o una combinación de componentes líquidos y sólidos. El portador es de manera deseable un portador fisiológicamente aceptable (por ejemplo, una 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 diana y/o las células, y el método particular usado para administrar la composición.

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

disoluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; las formulaciones que contienen estabilizadores y lioprotectores de proteína 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 líquida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra 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 mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxixelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En las condiciones de almacenamiento y uso habituales, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

El agente quimioterápico (por ejemplo, terapia anti-SPARC) acoplado a un compuesto o ligando que se une a una proteína SPARC puede formularse para dar una composición en forma neutra o de sal. 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. 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, procaina y similares.

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. Las siguientes formulaciones y métodos son meramente a modo de ejemplo y en modo alguno limitativos.

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

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles, isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o de dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado secado por congelación (liofilizado) lo 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, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente. En una realización preferida, 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). A este respecto, la formulación de manera deseable es adecuada para administración intratumoral, pero también puede formularse para inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, y similares.

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 puede presentarse como fórmulas en óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, o espumas de pulverización que contienen, además del principio activo, portadores tal como se conoce en la técnica que son apropiados.

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

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero no deben considerarse en modo alguno limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

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

Se ha demostrado que las nanopartículas de paclitaxel-albúmina (Abraxane, ABX o ABI-007) tienen una tasa de respuesta mejorada con respecto a Taxol (TAX) en un ensayo de cáncer de mama metastásico de fase 3 (el 33% frente al 19%, $p < 0,0001$) (véase, por ejemplo, O'Shaughnessy, SABCS). Recientemente se demostró el transporte transendotelial mediado por albúmina de paclitaxel (P) y la acumulación intratumoral aumentada de paclitaxel para

ABX frente a TAX (véase, por ejemplo, Desai, SABCS 2003). La albúmina se une a SPARC (véase, por ejemplo, Schnitzer, *J. Biol. Chem.*, 269, 6072-82 (1994)).

La línea de células de tumor MX-1 se deriva de un cáncer de mama humano. Se inmunotifieron criocortes en serie de xenoinjerto de tumor MX-1 humano, tejidos tumorales de mama primarios humanos (n=141) y tejido de mama humano normal (n=115) y se puntuaron (0-4) para tinción con albúmina, SPARC (usando anticuerpo anti-SPARC) y caveolina-1. También se inmunotifieron células MX-1 cultivadas para SPARC. Se prepararon nanopartículas de paclitaxel-albúmina (Abraxane, ABX o ABI-007) y Taxol (TAX) con paclitaxel radioactivo (P) (20 mg/kg i.v.), y se usaron para determinar la biodistribución de paclitaxel en tejidos normales de ratones atímicos.

La tinción con albúmina en el tumor MX-1 fue focal y colocalizada con SPARC (figura 3). La tinción con caveolina-1 confirmó que la densidad de vasos sanguíneos en zonas que contienen albúmina no era diferente de las zonas libres de albúmina. La expresión de SPARC mediante células MX-1 cultivadas se confirmó mediante tinción positiva con anticuerpo con anti-SPARC. La acumulación de paclitaxel en tejidos normales (negativos para SPARC) fue significativamente inferior para ABX en comparación con TAX ($p < 0,004$) para 7/10 tejidos. El 46% de los tumores de mama primarios humanos mostró fuerte tinción de SPARC (puntuación > 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 estadificación, el estado de ER o el estado de PgR; sin embargo, hubo una tendencia para una alta expresión de SPARC entre los tumores negativos para p53.

La colocalización de albúmina y SPARC sugiere que SPARC, mediante su actividad de unión a albúmina, puede comportarse como una diana intratumoral para la unión de albúmina en tumores de mama. Dado que 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 la de TAX, de acuerdo con la falta de expresión de SPARC en tejidos normales. El examen de pacientes para determinar SPARC permite la identificación de pacientes que más responden a ABX. La presencia de SPARC en estos tumores permite el direccionamiento y la terapia usando anticuerpos anti-SPARC.

Ejemplo 2

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

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

Ejemplo 3

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

Se determinó la expresión de SPARC en células de carcinoma de mama humanas usando un alineamiento tumoral de Cybrdi, Inc. (Gaithersburg, MD). Los resultados de este análisis se exponen en la tabla 1. La intensidad de la tinción se puntuó desde "negativa" hasta 4+, correspondiendo el número más alto a la mayor intensidad de sobreexpresión. El 49% del carcinoma de mama se tiñó positivo (2+ y superior) para SPARC, en comparación con el 1% de tejido normal ($p < 0,0001$).

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

Ejemplo 4

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

Las nanopartículas de paclitaxel (P)-albúmina (Abraxane, ABX o ABI-007) demostraron 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)). Los estudios en ratones atímicos han demostrado concentraciones de paclitaxel intratumoral un 30-40% superiores 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 un transporte caveolar mediado por receptor (gp60) específico (véase, por ejemplo, John *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 284, L187 (2001)). Se lanzó la hipótesis de que el paclitaxel unido a albúmina en ABX puede transportarse a través de EC de microvaso de tumor mediante gp60, y este mecanismo puede ser particularmente activo para ABX en comparación con TAX.

Se realizó una serie de experimentos para evaluar la unión y el transporte de paclitaxel mediante células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células endoteliales de microvaso de pulmón humano (HLMVEC) para ABX y TAX. Se usó paclitaxel fluorescente (FP) como sonda y se formularon ABX y TAX fluorescentes con FP para sondear la unión y el transporte de paclitaxel a través de monocapas de EC crecidas en un aparato Transwell.

La unión de paclitaxel a células (HUVEC) fue 10X mayor para ABX que para TAX. El transporte de paclitaxel desde ABX a través de las monocapas de EC se potenció en 2-3 veces y 2-4 veces para HUVEC y HMVEC, respectivamente y, en comparación con TAX. El transporte fue dependiente de albúmina. El transporte de paclitaxel desde ABX se inhibió 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 conocidos de la transcitosis caveolar, NEM y β -metilciclodextrina (BMC), también inhibieron el transporte de paclitaxel desde ABX a través de las monocapas endoteliales (figura 4). La inhibición del transporte caveolar disminuyó el transporte de P desde ABX hasta el nivel del transporte de TAX.

Estos resultados demuestran que paclitaxel se transporta activamente desde ABX 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 responsable en parte de las concentraciones intratumorales aumentadas 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 altas tasas de respuesta usando nanopartículas de paclitaxel unido a albúmina (ABI-007) en cánceres escamosos de cabeza y cuello.

En estudios clínicos de fase I y II de pacientes con carcinoma de células escamosas (SCC) de cabeza y cuello (H&N) y conducto anal, se observaron tasas de respuesta del 78% y el 64%, respectivamente, para nanopartículas de paclitaxel unido a albúmina administradas por vía intraarterial (Abraxane®, ABX o ABI-007) (véase, por ejemplo, Damascelli *et al.*, *Cancer*, 92(10), 2592-2602 (2001), y Damascelli *et al.*, *AJR*, 181, 253-260 (2003)). Comparando la citotoxicidad *in vitro* de ABX y Taxol (TAX), se observó que la línea escamosa de cuello (A431) demostró CI_{50} mejoradas para ABX (0,004 μ g/ml) frente a TAX (0,012 μ g/ml). Recientemente se demostraron el transporte caveolar transendotelial mediado por albúmina de paclitaxel (P) y la acumulación intratumoral aumentada de P para ABX frente a TAX (véase, por ejemplo, Desai, SABCS 2003).

Se inmunotifñeron tejidos de tumor de H&N humano (n=119) y tejido de H&N humano normal (n=15) y se puntuaron (0-4) para tinción de SPARC usando un alineamiento de tejido tumoral y normal. La inmunotinción se realizó usando anticuerpo policlonal de conejo anti-SPARC. En un nuevo estudio de aumento de la dosis de fase 1 (ABX administrado i.v. a lo largo de 30 minutos q3w), se analizó un subconjunto de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (n=3) para determinar la respuesta a ABX.

SPARC se sobreexpresó (puntuación > 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 pacientes con H&N lograron una respuesta parcial (PR) tras 2 ciclos de tratamiento a niveles de dosis de 135 mg/m² (1 pt) y 225 mg/m² (1 pt). Un tercer paciente a 260 mg/m² progresó.

Se encontró que SPARC se sobreexpresaba en el 60% de los tumores escamosos de H&N. Esto puede explicar la alta actividad de un solo agente de ABX observada anteriormente en cánceres escamosos de H&N debida a la unión de paclitaxel unido a albúmina a SPARC expresada en estos tumores. 2/3 de los pacientes con tumores escamosos de H&N lograron PR en un nuevo estudio de fase I.

• Tinción de SPARC

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

Se inmunotifñeron tejidos de tumor de H&N humano (n=119) y tejido de H&N humano normal (n=15) y se puntuaron

(0-4) para tinción de SPARC usando un alineamiento de tejido tumoral y normal. La inmunotinción se realizó usando anticuerpo policlonal de conejo anti-SPARC. SPARC se sobreexpresó (puntuación > 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 de un solo agente de ABX observada anteriormente en cánceres escamosos de H&N debido a la unión de paclitaxel unido a albúmina a SPARC expresada en estos tumores.

En un nuevo estudio de aumento de la dosis de fase I (ABX administrado i.v. a lo largo de 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 con H&N lograron respuesta parcial (PR) tras 2 ciclos de tratamiento a niveles de dosis de 135 mg/m^2 (1 pt) y 225 mg/m^2 (1 pt). Un tercer paciente a 260 mg/m^2 progresó. Se tiñeron tejidos tumorales de estos pacientes para determinar SPARC y 1 paciente que respondió mostró fuerte sobreexpresión para SPARC. En otro estudio clínico de fase II de 54 pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello tratado con ABX intraarterial, se observó una tasa de respuesta global del 78%. Se evaluaron biopsias de cáncer de 16 pacientes en este estudio que recibieron ABX intraarterial para determinar la expresión de SPARC y la correlación con la respuesta clínica. La tinción con anticuerpo policlonal anti-SPARC (R&D Systems, Mineápolis, MN, EE.UU.) se puntuó en una escala 0-4 (0= sin tinción, 4= positiva fuerte). La expresión positiva de SPARC se identificó como tinción > 2+ y la expresión negativa de SPARC se identificó como tinción < 2+. Los pacientes que respondieron a ABX mostraron una mayor incidencia de expresión de SPARC (10/11, 91%) frente a los que no respondieron (2/5, 40%) ($p=0,06$). La respuesta a ABX fue significativamente mayor para los pacientes positivos para SPARC (10/12 = 83%) frente a los pacientes negativos para SPARC (1/4 = 25%) ($p=0,06$). Además, los pacientes negativos para SPARC mostraron una tasa de respuesta significativamente menor que la tasa de respuesta global en el estudio (incluyendo los pacientes tratados con ABX u otros agentes quimioterápicos) (1/4, 25% frente a 42/54, 78%; ($p < 0,05$)).

Ejemplo 6

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

Se cultivaron células MX-1 sobre un cubreobjetos y se permeabilizaron con agentes adecuados. Las células se expusieron a albúmina fluorescente y tras el lavado se expusieron a anticuerpo frente a SPARC. A esto le siguió la exposición a anticuerpos secundarios que tenían un marcador fluorescente diferente de la albúmina. Se observó sorprendentemente que la albúmina marcada se colocalizó con la presencia de SPARC dentro de la célula lo que indica que la albúmina se internalizó rápidamente y seleccionaba como diana SPARC intracelular.

Ejemplo 7

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

Se hicieron crecer células endoteliales de microvaso de pulmón humano (HLMVEC) hasta la confluencia en un dispositivo Transwell. Se añadió la composición farmacéutica inventiva que comprende paclitaxel y albúmina, o Taxol que contiene paclitaxel fluorescente (Flutax) a una concentración de $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$, a la cámara superior del dispositivo Transwell.

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 solo Flutax sin albúmina. El control con Flutax no mostró transporte, lo que valida 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 composición de albúmina-paclitaxel y Taxol fueron de $1,396 \text{ h}^{-1}$ y $0,03 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. La cantidad total de paclitaxel transportado a través de la monocapa fue tres veces 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 otro receptor de células endoteliales puede ayudar en el transporte de un agente terapéutico deseado a través de la barrera endotelial al interior del intersticio tumoral.

Ejemplo 8

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

Se preparó un extracto de células completas usando células HUVEC mediante sonicación. Se separó la proteína en un 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 sola 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 celular aclarado como en la fracción de membrana rica en membrana.

Ejemplo 9

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

Se inmunotifieron tejido humano y de ratón normales y se puntuaron (0-4) para tinción de SPARC usando un alineamiento de tejido tumoral y normal. La inmunotinción se realizó usando anticuerpo policlonal de conejo anti-SPARC. SPARC no se expresó en ninguno de los tejidos normales, con la excepción del esófago. Asimismo, SPARC no se expresó en ninguno de los tejidos 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

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

Tejidos normales de ratón

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

Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra la superioridad de Abraxane (nanoparticle de albúmina unida a paclitaxel, "ABX") con respecto a Taxotere (docetaxel formulado con Tween 80 y etanol, "TAT") y que la respuesta relativa a ABX se correlaciona positivamente con la expresión de SPARC en xenoinjertos positivos para Her2 sometidos a prueba.

Se usó un sistema de modelo de xenoinjerto de tumor murino para comparar la eficacia de ABX frente a TAT en xenoinjertos negativos para Her2 de las líneas celulares de carcinoma de mama humano MX-1 y carcinoma de pulmón humano LX-1. En el estudio de MX-1, se usaron 8 animales en cada uno de tres grupos: TAT (una vez a la semana durante tres semanas, i.v.) a 15 mg/kg; ABX (una vez a la semana durante tres semanas, i.v.) a 15 mg/kg, y solución salina (una vez a la semana durante tres semanas, i.v.). Se obtuvo semanalmente el peso de cada animal y el tamaño tumoral durante tres semanas. En el estudio de LX-1, se usaron 8 animales en cada uno de tres grupos: TAT (una vez cada cuatro días durante tres ciclos, i.v.) a 15 mg/kg; ABX (una vez cada cuatro días durante tres ciclos, i.v.) a 50 mg/kg o 120 mg/kg, y solución salina (una vez cada cuatro días durante tres ciclos, i.v.). Se obtuvo semanalmente el peso de cada animal y el tamaño tumoral durante tres semanas.

Se determinó el estado de Her2 y SPARC en el tumor de xenoinjerto mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo monoclonal anti-Her2 humana y un anticuerpo policlonal anti-SPARC humana. Estos portaobjetos se puntuaron usando una escala de 0-4, siendo 0 negativo y siendo 4 positivo fuerte.

En el estudio de MX-1, ABX a dosis equivalentes fue más eficaz que TAT ($p < 0,0001$, estadística de ANOVA) (véase la figura 5A). Para las células LX-1, ABX fue más eficaz que TAT (15 mg/kg) a ambos niveles de dosis ($p = 0,0001$ para ABX 50 mg/kg y $p < 0,0001$ para ABX 120 mg/kg) (véase la figura 6A). Sin embargo, la respuesta a ABX no se correlacionó con el nivel de SPARC mediante inmunohistoquímica (véase la figura 7).

En un segundo estudio, se usó un sistema de modelo de xenoinjerto tumoral murino para comparar la eficacia de ABX frente a TAT en tres xenoinjertos positivos para Her2 (HT29: línea celular de carcinoma colónico humano, PC3: línea celular de carcinoma de próstata humano, MDA-MB-231: línea celular de carcinoma de mama humano). Se

usaron treinta y dos ratones para cada xenoinjerto con ocho animales tratados con TAT (una vez cada cuatro días durante tres ciclos, i.v.) a 15 mg/kg, ocho animales tratados con ABX (una vez cada cuatro días durante tres ciclos, i.v.) a 50 mg/kg, ocho animales tratados con ABX (una vez cada cuatro días durante tres ciclos, i.v.) a 120 mg/kg, y ocho animales de control tratados con solución salina (una vez cada cuatro días durante tres ciclos, i.v.). Se obtuvo

5 semanalmente el peso de cada animal y el tamaño tumoral durante tres semanas.

Se determinó el estado de Her2 y SPARC mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo monoclonal anti-Her2 humana y un anticuerpo policlonal anti-SPARC humana. Los portaobjetos se puntuaron usando una escala de 0-4, siendo 0 negativo y siendo 4 positivo fuerte.

10 En el xenoinjerto de HT29, ABX fue más eficaz que TAT (15 mg/kg) a ambos niveles de dosis ($p = 0,0057$ para ABX 50 mg/kg y $p < 0,0001$ para ABX 120 mg/kg) (véase la figura 8A). Con el xenoinjerto de PC3, ABX fue menos eficaz que TAT (15 mg/kg) a 50 mg/kg ($p < 0,001$) pero igual de eficaz que TAT (15 mg/kg) a 120 mg/kg ($p = \text{ns}$) (figura 9A) y menos tóxico (menos pérdida de peso, figura 9B). Finalmente, con el xenoinjerto de MDA-MB-231, ABX fue menos eficaz que TAT (15 mg/kg) a ambos niveles de dosis ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$) (véase la figura 10A).

15 En la figura 7A se muestra el estado de Her2 y SPARC de los cinco tipos de tumor y en la figura 7B se muestra la eficacia relativa de ABX frente a TAX. La eficacia relativa (volumen de tumor con TAT/volumen de tumor con ABX) se calculó usando TAT 15 mg/kg y ABX 120 mg/kg, (excepto para MX-1 donde la eficacia tumoral relativa se calculó usando TAX 15 mg/kg y ABX 15 mg/kg.) En los xenoinjertos positivos para Her2 (HT29, PC3 y MDA-MB-231), la eficacia relativa con ABX con respecto a TAT aumentó con la expresión creciente de SPARC (véase la figura 7).

20 Por tanto, este ejemplo muestra que, en el sistema modelo usado, en cuatro de cinco tumores de xenoinjerto sometidos a prueba, ABX fue más eficaz o igualmente eficaz en comparación con TAT y que, en los xenoinjertos positivos para Her2 sometidos a prueba, la eficacia de ABX en relación con TAX está correlacionada positivamente con la expresión de SPARC.

Lista de secuencias

<110> TRIEU, Vuong

25 DESAI, Neil P.

SOON-SHIONG, Patrick

<120> SPARC Y MÉTODOS DE USO DE LA MISMA

<130> 257260

<160> 2

30 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 303

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 1

ES 2 687 076 T3

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

ES 2 687 076 T3

Thr Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Asp Asn Asn Leu Leu Thr Glu Lys Gln
180 185 190

Lys Leu Arg Val Lys Lys Ile His Glu Asn Glu Lys Arg Leu Glu Ala
195 200 205

Gly Asp His Pro Val Glu Leu Leu Ala Arg Asp Phe Glu Lys Asn Tyr
210 215 220

Asn Met Tyr Ile Phe Pro Val His Trp Gln Phe Gly Gln Leu Asp Gln
225 230 235 240

His Pro Ile Asp Gly Tyr Leu Ser His Thr Glu Leu Ala Pro Leu Arg
245 250 255

Ala Pro Leu Ile Pro Met Glu His Cys Thr Thr Arg Phe Phe Glu Thr
260 265 270

Cys Asp Leu Asp Asn Asp Lys Tyr Ile Ala Leu Asp Glu Trp Ala Gly
275 280 285

Cys Phe Gly Ile Lys Gln Lys Asp Ile Asp Lys Asp Leu Val Ile
290 295 300

<210> 2

<211> 3178

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

gttgctgtgc tctaaacccc tccacattcc cgcggtcctt cagactgccc ggagagcgcg	60
ctctgcctgc cgcctgcctg cctgccactg agggttccca gcaccatgag ggcctggatc	120
ttctttctcc tttgcctggc cgggagggcc ttggcagccc ctcagcaaga agccctgcct	180
gatgagacag aggtggtgga agaaactgtg gcagaggtga ctgaggtatc tgtgggagct	240
aatcctgtcc aggtggaagt aggagaattt gatgatggtg cagaggaaac cgaagaggag	300
gtggtggcgg aaaatccctg ccagaaccac cactgcaaac acggcaaggt gtgcgagctg	360
gatgagaaca acacccccat gtgcgtgtgc caggacccca ccagctgccc agccccatt	420
ggcgagttag agaaggtgtg cagcaatgac aacaagacct tcgactcttc ctgccacttc	480
tttgccacaa agtgcaccct ggagggcacc aagaagggcc acaagctcca cctggactac	540
atcgggcctt gcaaatacat ccccccttgc ctggactctg agctgaccga attccccctg	600
cgcctgcggg actggctcaa gaacgtcctg gtcaccctgt atgagaggga tgaggacaac	660
aaccttctga ctgagaagca gaagctgcgg gtgaagaaga tccatgagaa tgagaagcgc	720

ES 2 687 076 T3

ctggaggcag gagaccaccc cgtggagctg ctggcccggg acttcgagaa gaactataac	780
atgtacatct tccctgtaca ctggcagttc ggccagctgg accagcaccc cattgacggg	840
tacctctccc acaccgagct ggctccactg cgtgctcccc tcatccccat ggagcattgc	900
accacccgct ttttcgagac ctgtgacctg gacaatgaca agtacatcgc cctggatgag	960
tgggccggct gcttcggcat caagcagaag gatatcgaca aggatcttgt gatctaaatc	1020
cactccttcc acagtaccgg attctctctt taaccctccc cttcgtgttt cccccaatgt	1080
ttaaaatgtt tggatggttt gttgttctgc ctggagacaa ggtgctaaca tagatttaag	1140
tgaatacatt aacggtgcta aaaatgaaaa ttctaacca agacatgaca ttcttagctg	1200
taacttaact attaaggcct tttccacacg cattaatagt cccatttttc tcttgccatt	1260
tgtagctttg cccattgtct tattggcaca tgggtggaca cggatctgct gggctctgcc	1320
ttaaacacac attgcagctt caacttttct ctttagtggt ctgtttgaaa ctaactta	1380
ccgagtcaga ctttgtgttc atttcatttc agggctcttg ctgcctgtgg gcttccccag	1440
gtggcctgga ggtgggcaaa gggaagtaac agacacacga tgttgcaag gatggttttg	1500
ggactagagg ctcagtgggt ggagagatcc ctgcagaacc caccaaccag aacgtggttt	1560
gcctgaggct gtaactgaga gaaagattct ggggctgtgt tatgaaaata tagacattct	1620
cacataagcc cagttcatca ccatttcctc ctttaccttt cagtgcagtt tcttttcaca	1680
ttaggctgtt ggttcaaact tttgggagca cggactgtca gttctctggg aagtggtcag	1740
cgcctcctgc agggcttctc ctccctctgtc ttttgagaa ccagggtctc tctcaggggc	1800
tctagggact gccaggctgt ttcagccagg aaggccaaaa tcaagagtga gatgtagaaa	1860
gttgtaaaat agaaaaagtg gagttggtga atcggttgtt ctttcctcac atttgatga	1920
ttgtcataag gtttttagca tgttcctct tttcttcacc ctcccctttt ttcttctatt	1980
aatcaagaga aacttcaaag ttaatgggat ggtcggatct cacaggctga gaactcgttc	2040
acctccaagc atttcatgaa aaagctgctt cttattaatc atacaaactc tcaccatgat	2100
gtgaagagtt tcacaaatcc ttcaaaataa aaagtaatga cttagaaact gccttcctgg	2160
gtgatttgca tgtgtcttag tcttagtcac cttattatcc tgacacaaaa acacatgagc	2220
atacatgtct acacatgact acacaaatgc aaacctttgc aaacacatta tgcttttgca	2280
cacacacacc tgtacacaca caccggcatg tttatacaca gggagtgtat ggttcctgta	2340
agcactaagt tagctgtttt catttaatga cctgtgggtt aacccttttg atcactacca	2400
ccattatcag caccagactg agcagctata tccttttatt aatcatggtc attcattcat	2460
tcattcattc acaaaatatt tatgatgtat ttactctgca ccagggtcca tgccaagcac	2520
tggggacaca gttatggcaa agtagacaaa gcatttggtc atttgagct tagagtccag	2580

ES 2 687 076 T3

```

gaggaataca ttagataatg acacaatcaa atataaattg caagatgtca caggtgtgat 2640
gaagggagag taggagagac catgagtatg tgtaacagga ggacacagca ttattctagt 2700
gctgtactgt tccgtacggc agccactacc cacatgtaac tttttaagat ttaaatttaa 2760
attagttaac attcaaaacg cagctcccca atcacactag caacatttca agtgcttgag 2820
agccatgcat gattagtggc taccctattg aataggtcag aagtagaatc ttttcatcat 2880
cacagaaagt tctattggac agtgctcttc tagatcatca taagactaca gagcactttt 2940
caaagctcat gcatgttcat catgttagtg tcgtattttg agctgggggtt ttgagactcc 3000
ccttagagat agagaaacag acccaagaaa tgtgctcaat tgcaatgggc cacataccta 3060
gatctccaga tgtcatttcc cctctcttat ttttaagttat gttaagatta ctaaaacaat 3120
aaaagctcct aaaaaatcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 3178

```

REIVINDICACIONES

1. Agente quimioterápico para su uso en un método de tratamiento de un tumor de mama en un mamífero, comprendiendo el método una etapa de detección de la expresión de la proteína SPARC y la presencia de expresión de Her2 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica que se ha aislado del tumor, en el que el agente quimioterápico va a administrarse al mamífero si se identificó estado de Her2 positivo y expresión de SPARC positiva como tinción > 2+, y en el que el agente quimioterápico comprende partículas de paclitaxel unido a albúmina del cual más del 50% del paclitaxel está en forma de nanopartícula.
2. Agente para su uso según la reivindicación 1, en el que la dosis de paclitaxel es de desde 30 mg/m² hasta 1000 mg/m² con un ciclo de dosificación de aproximadamente 3 semanas.
3. Agente para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el mamífero es un ser humano.
4. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el tumor de mama es un carcinoma de mama.

FIG. 1

SEQ ID NO: 1 - secuencia de aminoácidos de SPARC silvestre
(De Genbank NM_003118. [gi:48675809])

MRAWIFFLLCLAGRALAAPQQEALPDETEVVEETVAEVTEVSVG
ANPVQVEVGEFDDGAEETEEEVVAENPCQNHCKHGKVCELDENNTPMCVCQDPTSCP
APIGEFEKVCSDNKTDFDSSCHFFATKCTLEGTKKGHKLHLDYIGPCKYIPPCLDSEL
TEFPLMRDWLKNVLTLYERDEDNNLLTEKQKLRVKKIHENEKRL EAGDHPVELLAR
DFEKNYNMYIFPVHWQFGQLDQHPIDGYLSHTELAPLRAPLIPMEHCTTRFFETCDLD
NDKYIALDEWAGCFGIKQKDIDKDLVI

FIG. 2

SEQ ID NO: 2-SECUENCIA DE ADNc DE SPARC SILVESTRE

```

1 gttgctgtgc tctaaacccc tccacattcc cgcggtectt cagactgccc ggagagcgcg
61 ctctgcctgc cgctgcctgc cctgccactg aggggttccca gcaccatgag ggccctggatc
121 ttctttctcc tttgcctggc cgggagggcc ttggcagccc ctcagcaaga agccctgcct
181 gatgagacag aggtggtgga agaaactgtg gcagaggtga ctgaggtatc tgtgggagct
241 aatcctgtcc aggtggaagt aggagaattt gatgatggtg cagaggaaac cgaagaggag
301 gtgggtggcg aaaatccctg ccagaaccac cactgcaaac acggcaaggt gtgagagctg
361 gatgagaaca acacccccat gtgcgtgtgc caggacccca ccagctgccc agccccattt
421 ggcgagtttg agaaggtgtg cagcaatgac aacaagacct tcgactcttc ctgccacttc
481 tttgccacaa agtgcacctt ggagggcacc aagaagggcc acaagctcca cctggactac
541 atcgggcctt gcaaatatcat ccccccttgc ctggactctg agctgaccga attccccctg
601 cgcctgcggg actggctcaa gaacgtctct gtcacctgt atgagaggga tgaggacaac
661 aaccttctga ctgagaagca gaagctgcgg gtgaagaaga tccatgagaa tgagaagcgc
721 ctggaggcag gagaccaccc cgtggagctg ctggcccggg acttcgagaa gaactataac
781 atgtatcatc tccctgtaca ctggcagttc ggccagctgg accagcacc ccttgacggg
841 tacctctccc acaccgagct ggctccactg cgtgctcccc tcatcccat ggagcattgc
901 accaccgctt ttttcgagac ctgtgacctg gacaatgaca agtacatcgc cctggatgag
961 tgggcgggct gcttcggcat caagcagaag gatatcgaca aggatcttgt gatctaaatc
1021 cactccttcc acagtaccgg attctctctt taacctccc cttcgtgtt ccccaatgt
1081 ttaaaatggt tggatggttt gttgttctgc ctggagacaa ggtgctaaca tagatttaag
1141 tgaatacatt aacggtgcta aaaaataaaa ttctaaccac agacatgaca ttcttagctg
1201 taacttaact attaaggcct tttccacacg cattaatagt cccatttttc tcttgccatt
1261 tgtagctttg cccattgtct tattggcaca tgggtggaca cggatctgct gggctctgcc
1321 ttaaacacac attgcagctt caacttttct ctttagtggt ctgtttgaaa ctaatactta
1381 ccgagtcaga ctttgtgttc atttcatttc agggctcttg ctgctgtgg gcttccccag
1441 gtggcctgga ggtgggcaaa gggaagtaac agacacacga tgttgtaag gatggttttg
1501 ggactagagg ctgagtggtg ggagagatcc ctgcagaacc caccaaccag aacgtgggtt
1561 gctgagggct gtaactgaga gaaagattct ggggctgtgt tatgaaaata tagacattct
1621 cacataagcc cagttcatca ccatttcttc ctttaccttt cagtgcagtt tcttttcaca
1681 ttaggtgtgt ggttcaaaat tttggagca cggactgtca gttctctggg aagtggctag
1741 cgcactctgc agggcttctc ctctctgtgc ttttgagaaa ccagggtctc tctcaggggc
1801 tctagggact gccaggctgt ttcagccagg aaggccaaaa tcaagagtga gatgtagaaa
1861 gttgttaaat agaaaaagtg gagttggtga atcggttgtt ctttctctac atttgatga
1921 ttgtcataag gtttttagca tgttctctct tttcttcacc ctcccccttt ttcttctatt
1981 aatcaagaga aacttcaaag ttaatgggat ggtcggatct cacaggctga gaactcgttc
2041 acctccaagc atttcatgaa aaagctgctt cttattaatc atacaaactc tcaccatgat
2101 gtgaagagtt tcacaaatcc ttcaaaataa aaagtaatga cttagaaact gccttctctg
2161 gtgatttgca tgtgtcttag tcttagtcac cttattatcc tgacacaaaa acacatgagc
2221 atacatgtct acacatgact acacaaatgc aaacctttgc aaacacatta tgcttttgca
2281 cacacacacc tgtacacaca caccggcatg tttatacaca gggagtgtat ggttctgtga
2341 agcactaagt tagctgtttt catttaatga cctgtggttt aaccttttg atcactacca
2401 ccattatcag caccagactg agcagctata tcccttttatt aatcatgggtc attcatctat
2461 tcattcatct acaaaatatt tatgatgtat ttactctgca ccaggctcca tgccaagcac
2521 tggggacaca gttatggcaa agtagacaaa gcatttggtc atttgagct tagagtccag
2581 gaggaataca ttagataatg acacaatcaa atataaattg caagatgtca caggtgtgat
2641 gaaggagag taggagagac catgagtatg tgtaacagga ggacacagca ttattctagt
2701 gctgtactgt tccgtacggc agccactacc cacatgtaac tttttaagat ttaaatataa
2761 attagttaac attcaaaacg cagctcccca atcacactag caacatttca agtgcttgag
2821 agccatgcat gattagtggg tacctatttg aataggctcag aagtagaatc ttttcatcat
2881 cacagaaagt tctattggac agtgctcttc tagatcatca taagactaca gagcactttt
2941 caaagctcat gcatgttcat catgttagtg tcgtattttg agctggggtt ttgagactcc
3001 ccttagagat agagaaacag acccaagaaa tgtgctcaat tgcaatgggc cacataccta
3061 gatctccaga tgtcatttcc cctctcttat ttaagtatat gttaagatta ctaaaacaat
3121 aaaagctcct aaaaaatcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa

```

FIG. 3

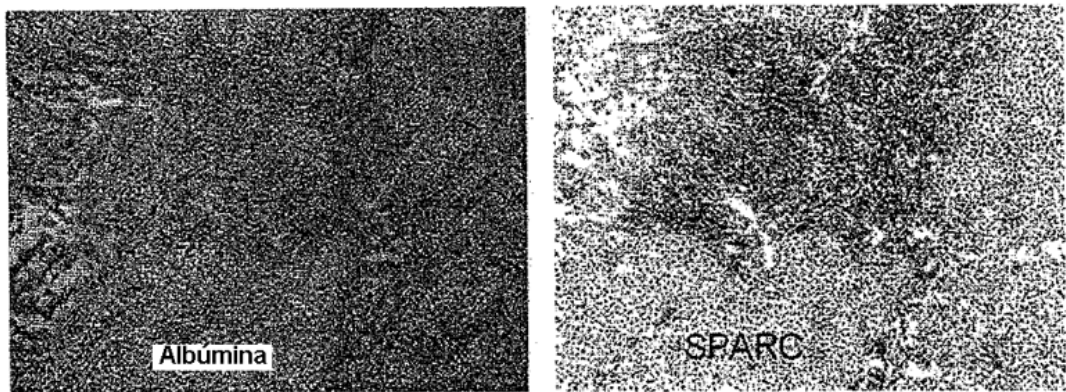


FIG. 4

Transcitosis de paclitaxel a través de monocapas de células endoteliales

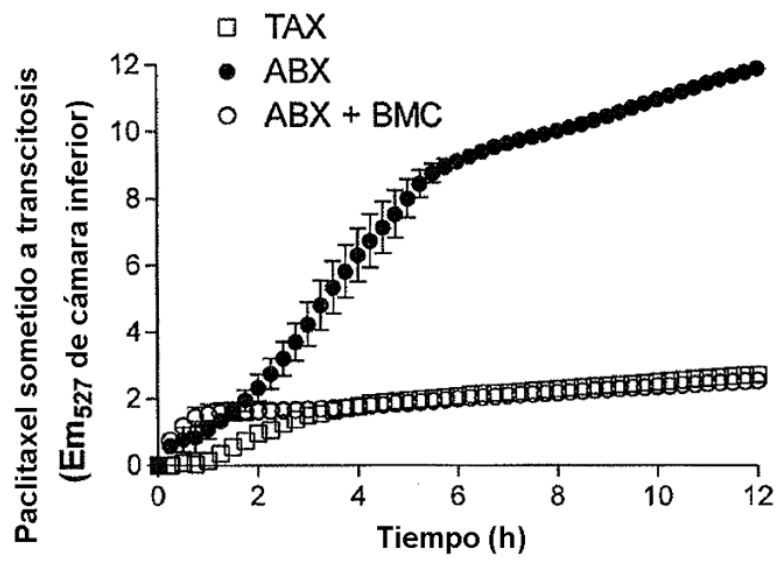


FIG. 5A

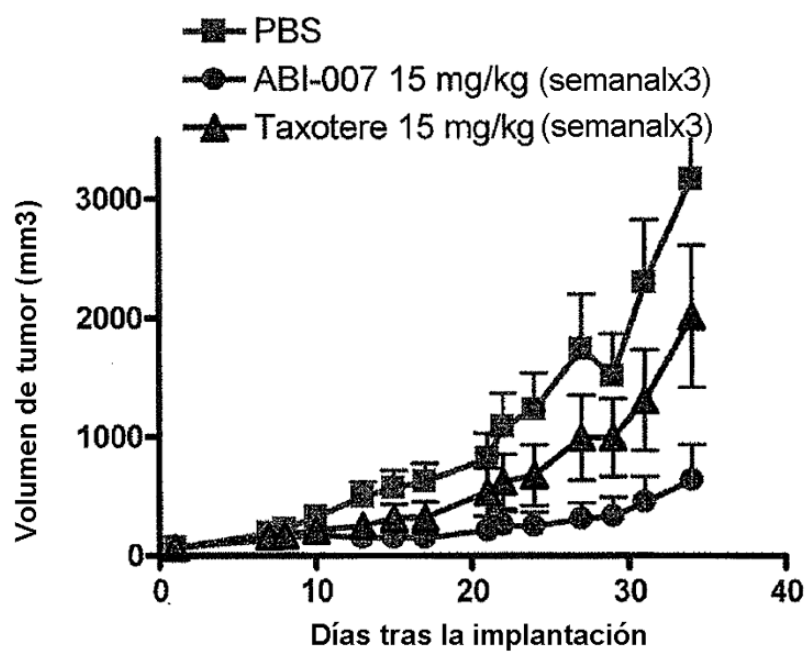


FIG. 5B

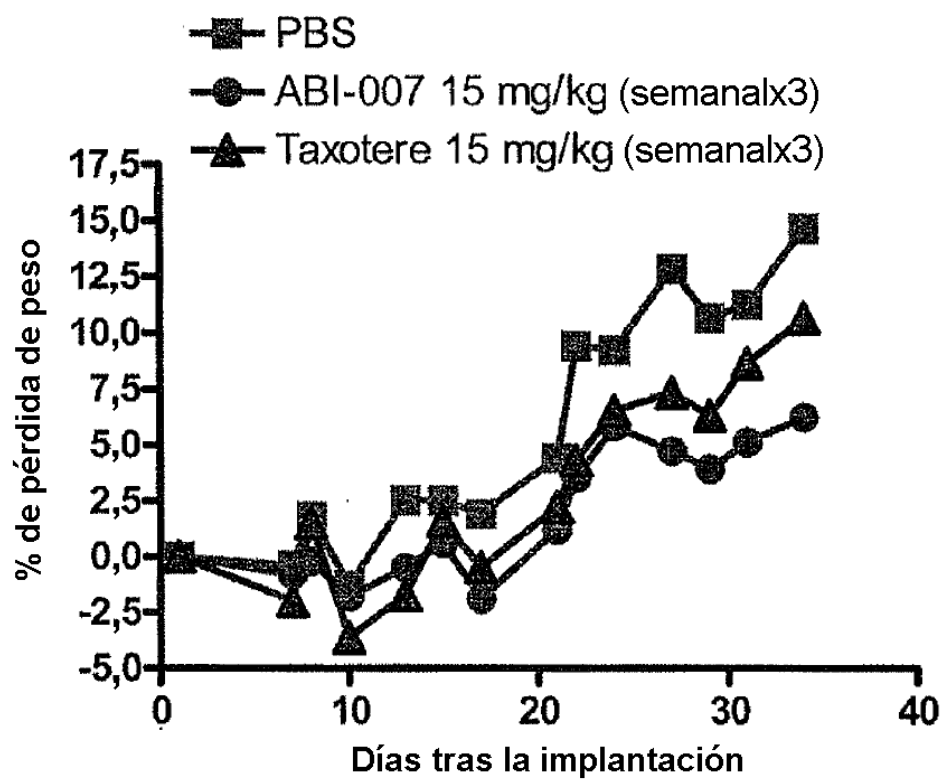


FIG. 6A

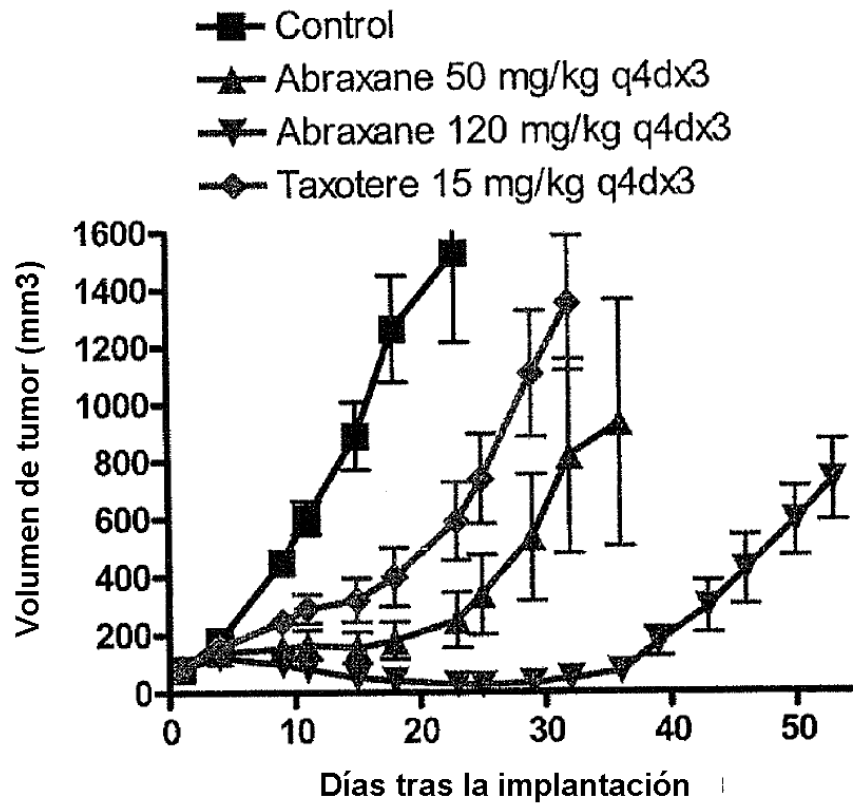


FIG. 6B

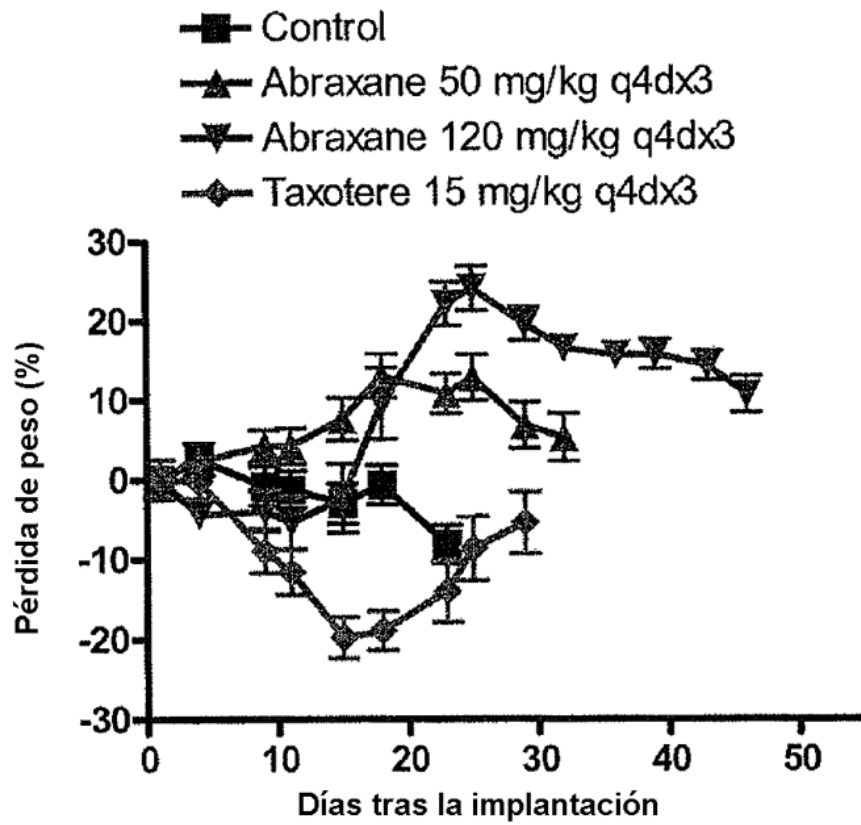


FIG. 7A

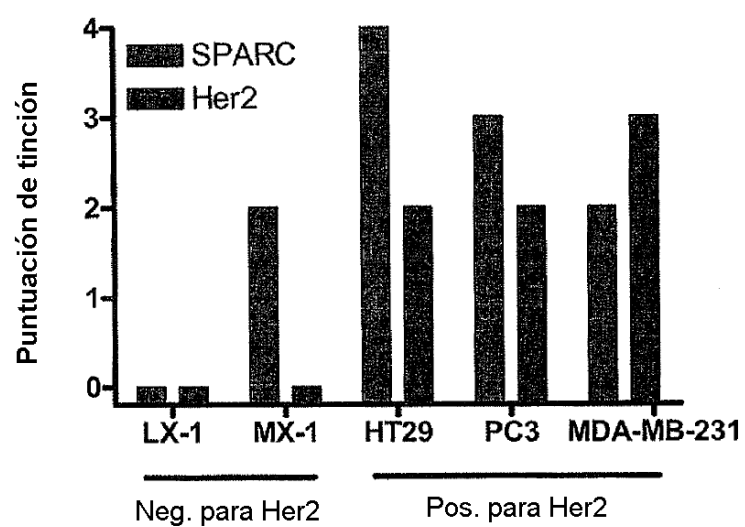


FIG. 7B

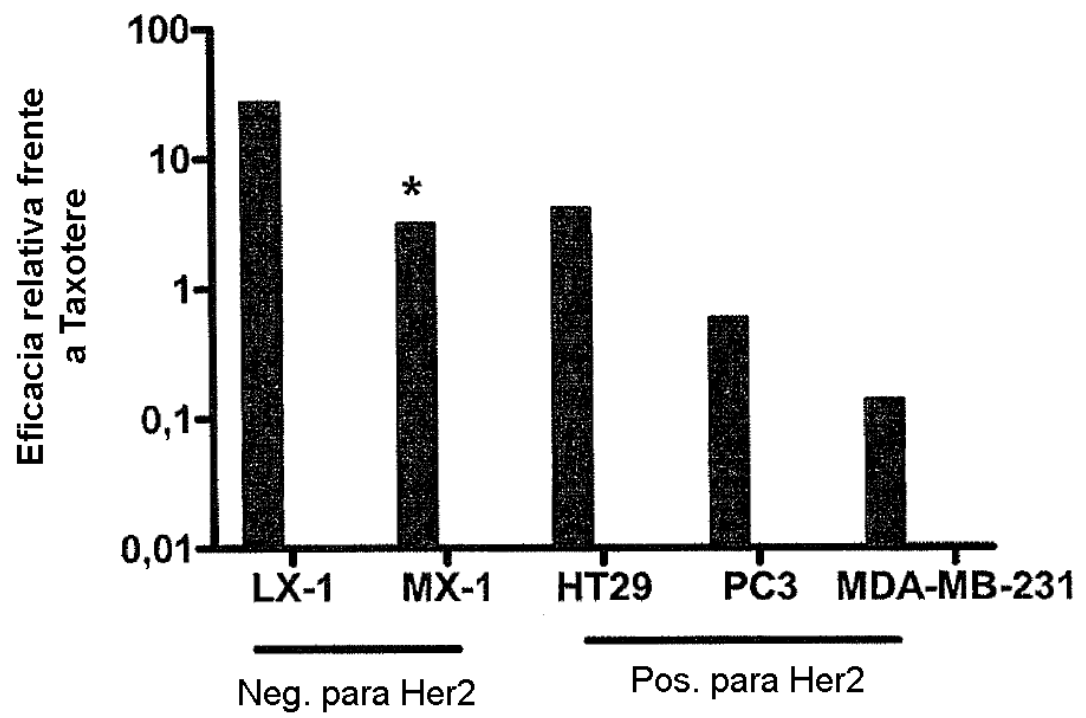


FIG. 8A

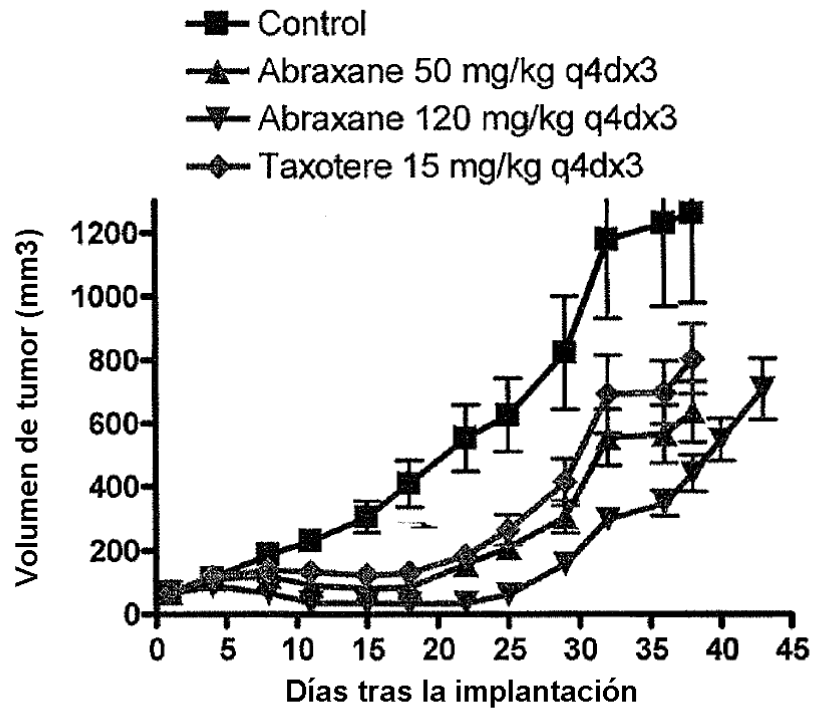


FIG. 8B

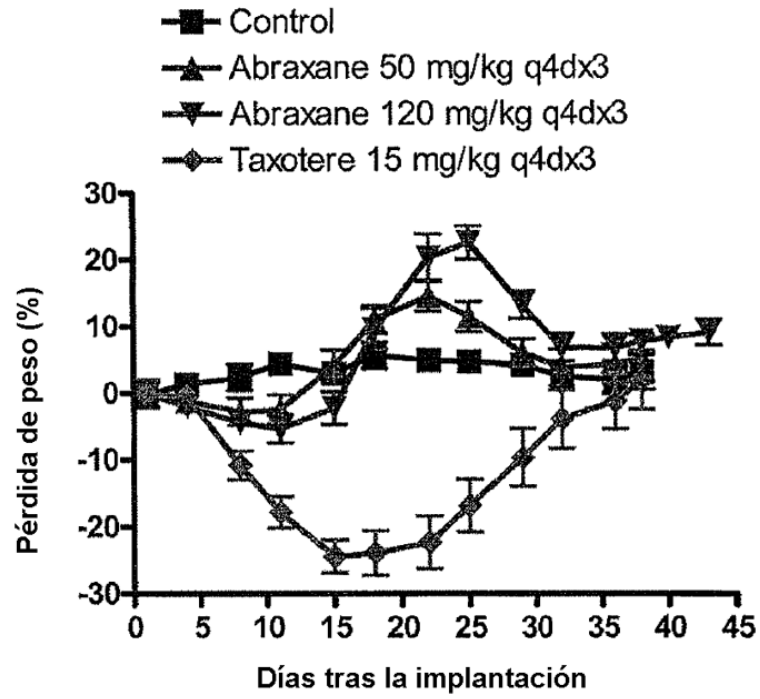


FIG. 9A

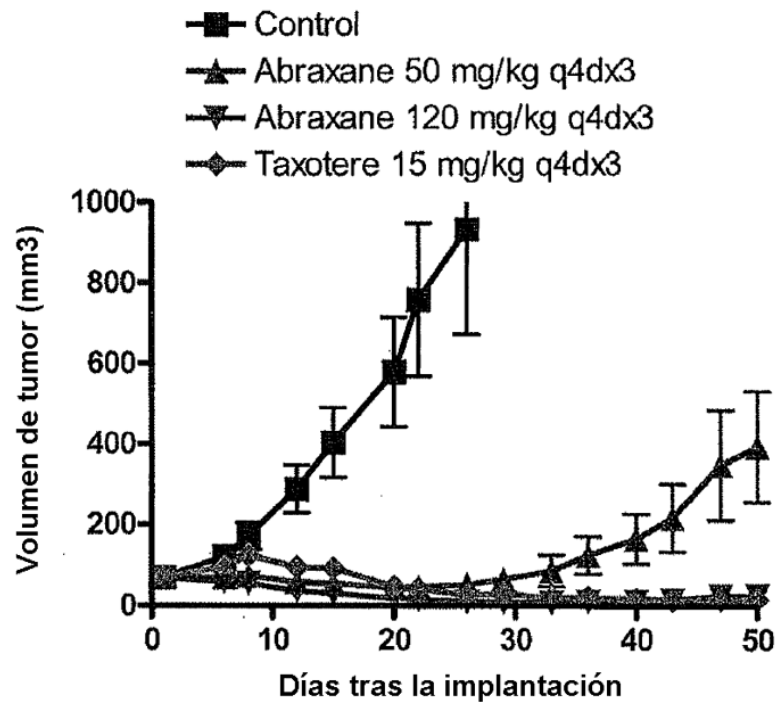


FIG. 9B

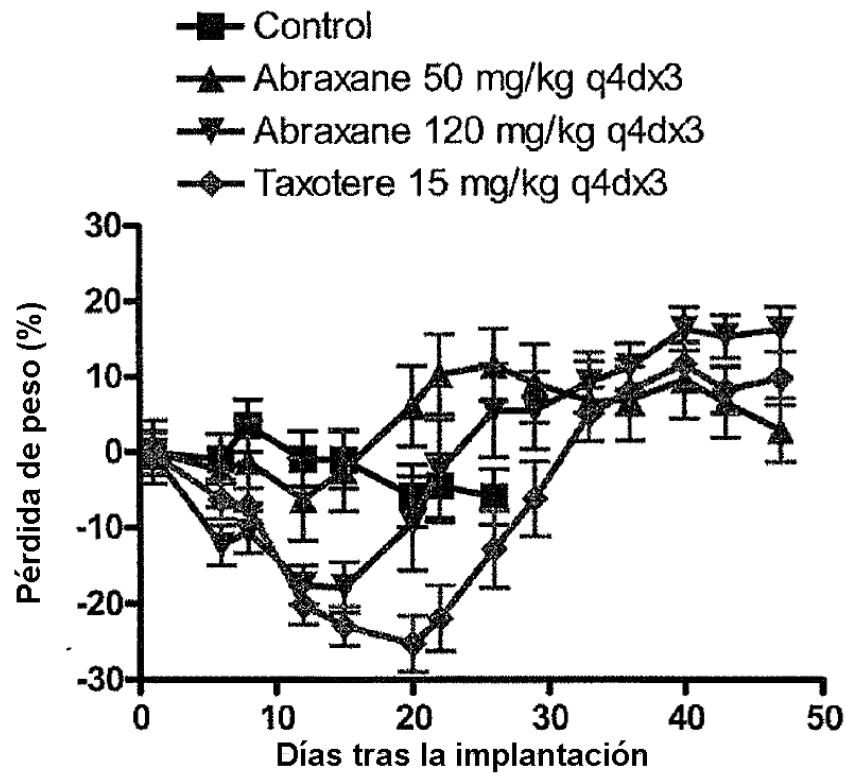


FIG. 10A

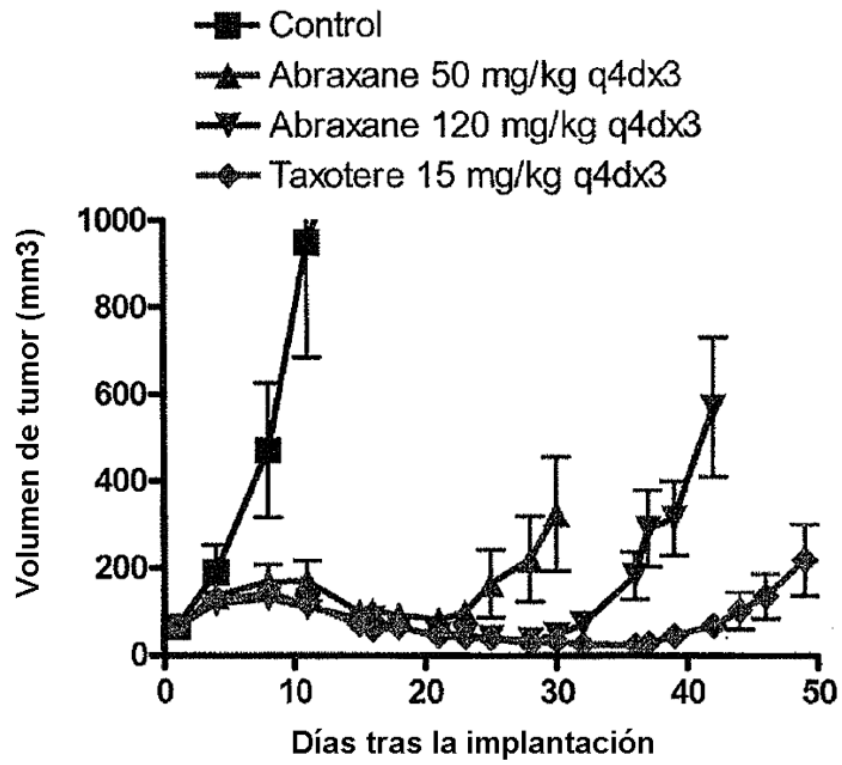


FIG. 10B

