



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0315735-0 B1



(22) Data do Depósito: 28/10/2003

(45) Data de Concessão: 30/10/2018

(54) Título: MÉTODO PARA O ENSAIO DE NGF A DIAGNOSE IN VITRO DE CÂNCER DE MAMA E USO TERAPÊUTICO

(51) Int.Cl.: G01N 33/574.

(30) Prioridade Unionista: 28/10/2002 FR 02/13428.

(73) Titular(es): BIOMÉRIEUX; UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE.

(72) Inventor(es): ERIC ADRIAENSSENS; GENEVIÈVE CHOQUET-KASTYLEVSKY; LAURENT DOLLE; BELKOURA IKRAM ELYAZIDI; HUBERT HONDERMARCK.

(86) Pedido PCT: PCT FR2003003193 de 28/10/2003

(87) Publicação PCT: WO 2004/040312 de 13/05/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/04/2005

(57) Resumo: "MÉTODO PARA O ENSAIO DE NGF PARA A DIAGNOSE IN VITRO DE CÂNCER DE MAMA E USO TERAPÊUTICO". A presente invenção refere-se a um método para a diagnose in vitro de câncer de mama, o qual consiste em determinar a presença de NGF em uma amostra biológica derivada de um paciente suspeito de sofrer de câncer de mama. O dito método pode ser usado tanto em diagnose precoce, exame, acompanhamento terapêutico e prognóstico, quanto na diagnose de recorrência no caso de câncer de mama. A presente invenção também diz respeito ao uso de um par para ligação ao NGF ou de um inibidor do NGF para preparar um produto medicinal, o dito produto medicinal sendo, em particular, útil para bloquear a proliferação do tumor e a disseminação distante em pacientes sofrendo de câncer de mama. Aplicações: diagnose e terapia.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA O ENSAIO DE NGF PARA A DIAGNOSE *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA E USO TERAPÊUTICO**".

A presente invenção refere-se ao campo da cancerologia. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a um método para a diagnóstico de câncer de mama em um paciente humano por determinação da presença do fator do crescimento nervoso (NGF) em uma amostra biológica derivada deste paciente, sendo possível para o dito método ser usado tanto em diagnose precoce, exame, acompanhamento terapêutico e prognóstico, quanto em diagnose de recorrência no caso do câncer de mama. Além disso, devido à capacidade das células de câncer de mama de produzirem o NGF, a presente invenção também se refere-se à terapia.

Nas mulheres, o câncer de mama é a principal causa de mortalidade devida a câncer em países industrializados. É estimado que o tamanho mínimo de um tumor que pode ser detectado por mamografia é 1 cm. Os cânceres de mama desenvolvem-se lentamente. Entretanto, este pequeno tumor tem um passado evolutivo de 8 anos, em média, na hora da diagnose. A etiologia do câncer de mama não está bem definida. Têm sido demonstradas predisposições familiares. A idade é o fator de risco mais importante. Assim, o risco aumenta em 0,5% por ano de idade nos países no ocidente. São conhecidos outros fatores de risco, tais como o número de gravidezes e a idade da primeira gravidez, alimentação pelo peito, a idade na puberdade e na menopausa, tratamentos estrogênicos após ter ocorrido a menopausa, estresse e nutrição.

O teste disponível e usado no exame em massa para o câncer de mama é uma técnica de formação de imagem: a mamografia. Em virtude desta técnica, a mortalidade devida a câncer de mama tem diminuído muito (30% de redução na mortalidade), o que salienta a importância do exame de tumor em termos de saúde pública. Entretanto, as técnicas de exame sofrem de um certo número de desvantagens. A mamografia requer um material de alto desempenho e pessoal qualificado, o que é caro no caso de exame em massa.

Na prática clínica, a caracterização de um tumor em termos de malignidade é realizada, após ele ter sido descoberto, por métodos histológicos em laboratórios especializados. Um conjunto de parâmetros, tais como o tamanho do tumor, o seu grau histopatológico, e a inflamação associada com a invasão dos linfóides, é usado para decidir sobre a terapia e para estimar o prognóstico para a doença.

Marcadores que tornam possível distinguir entre as células de tumor e as células normais têm sido pesquisados e estudados por anos para o câncer de mama. Eles tornariam possível diagnosticar a doença no princípio, para estabelecer o seu prognóstico e a sua sensibilidade ao tratamento, e para monitorar a sua evolução. Até agora, os marcadores candidatos que têm sido identificados e estudados têm sido os oncogenes, os marcadores de tecidos e os marcadores associados com a angiogênese ou com as capacidades metastáticas do tumor. Atualmente, os marcadores de câncer de mama que foram identificados são usados principalmente para o acompanhamento terapêutico. Não existe nenhum teste biológico confirmado para a diagnose precoce ou para o exame do câncer de mama. Somente a detecção de receptores de estrogênio sobre o tecido de tumor torna possível determinar se os tumores serão ou não sensíveis aos hormônios.

Um número limitado de marcadores antigênicos, em particular o CA 15-3 (Basuyau, J.P., M. P. Blanc-Vincent, J. M. Bidart, A. Daver, L. Deneux, N. Eche, G. Gory-Delabaere, M. F. Pichon, e J. M. Riedinger. 2000. [Standards, Options and Recommendations (SOR) for tumor markers in breast cancer. SOR Working Group]. Bull Cancer. 87:723-37), foi identificado no caso de células mamárias cancerosas. Este marcador é usado na prática comum para o acompanhamento dos pacientes, em particular para a detecção de recorrência, porém, devido à sua baixa sensibilidade, ele não é proposto em um teste de exame ou diagnóstico.

Por diversos anos, têm sido desenvolvidos estudos que se relacionam aos antígenos associados ao câncer de mama, não para pesquisar marcadores, porém para pesquisar alvos para a imunoterapia. Estes variam da demonstração da imunidade humoral contra os antígenos T/Tn (Springer,

G. F. 1997. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. J Mol Med. 75:594-604), até a descoberta mais recente de anticorpos e de respostas das células T dirigidas contra p53 (Gnjatic, S., Z. Cai, M. Viguier, S. Chouaib, J. G. Guillet, e J. Choppin. 1998. Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope presented by breast carcinomas and melanomas. J Immunol. 160:328-33) e HER-2/neu (Disis, M. L., e M. A. Cheever. 1997. HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. Adv Cancer Res. 71:343-71).

10 Mais recentemente, uma série de novos antígenos potenciais foi demonstrada pela abordagem de SEREX (clonagem de expressão sorológica), com base na construção de bibliotecas de cDNA de células de tumor e exame com o soro autólogo. Um exame sorológico da biblioteca de câncer de mama, desse modo, torna possível demonstrar o antígeno *ING1* (Jager, D., E. Stockert, M. J. Scanlan, A. O. Gure, E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, e Y. T. Chen. 1999. Cancer-testis antigens and *ING1* tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific *ING1* transcripts and a homologue gene. Cancer Res. 59:6197-204), seguido por um novo antígeno de diferenciação *NY-BR-1*, que é expresso, de acordo com os autores, em 80% dos cânceres de mama e induz a produção de anticorpos de IgG nos pacientes (Jager, D., E. Stockert, A. O. Gure, M. J. Scanlan, J. Karbach, E. Jager, A. Knuth, L. H. Old, e Y. T. Chen 2001. Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. Cancer Res. 61:2055-61).
20 Este tipo de abordagem, que tem sido principalmente usada para pesquisar alvos que potencialmente possam ser usados para desenvolver vacinas, não exclui, *a priori*, os antígenos presentes no tecido normal (este é o caso do *NY-BR-1*), nem aqueles reconhecidos por um número limitado de soros de pacientes (2/14 para o *ING1*); eles não são, portanto, exploráveis para uma
25 estratégia de exame ou diagnose precoce. Usando a mesma abordagem, têm sido observados outros antígenos que induzem uma resposta imune humoral em pacientes, tais como o NY-BR-62, o NY-BR-85 e a proteína
30

D52. Estes antígenos são acreditados serem superexpressos, respectivamente, em 60%, 90% e 60% dos cânceres de mama (Scanlan, M. J., e D. Jager. 2001. Cancer Challenges to the development of antigen-specific breast cancer vaccines. *Breast Res.* 3:95-8).

5 Os fenômenos moleculares que resultam no desenvolvimento de um câncer de mama envolvem modificações da estrutura e da expressão de oncogenes (tais como ras) e de genes supressores de tumor, tais como p53. Na maior parte dos cânceres de mama, o crescimento das células de tumor é dependente dos hormônios estrogênicos (estradiol e progesterona) e de

10 fatores do crescimento que controlam a proliferação, a migração e a apoptose. Estes fatores do crescimento estimulam ou inibem a proliferação, a migração e a diferenciação das células de tumor de um modo tal a atuarem em comum acordo para favorecerem o crescimento do câncer e as metástases. Por exemplo, os fatores do crescimento do tipo insulina, o fator do cresci-

15 mento de transformação α (TGF- α) e os fatores do crescimento de fibroblastos (FGFs) podem todos estimular a proliferação das células do câncer de mama, enquanto que o inibidor do fator do crescimento mamário derivado (MDGI) e o fator do crescimento de transformação β (TGF- β) inibem o seu crescimento.

20 S. Descamps et al., demonstraram que o fator do crescimento NGF, que foi o primeiro fator neurotrófico descoberto, quando adicionado *in vitro* a linhagens de células em cultura (NGF exógeno), é potencialmente capaz de ativar tanto a sobrevivência quanto a proliferação de células do câncer de mama (1998, *J. Biol. Chem.*, 273(27), 16659-16662 e 2001, *J. Biol. Chem.*, 276(21), 17864-17870).

25

O NGF foi inicialmente isolado por sua capacidade de estimular tanto a sobrevivência quanto a diferenciação dos neurônios periféricos, mais tarde tornando-se o elemento arquetípico da família de polipeptídeos neurotróficos (Levi-Montalcini, R., 1987, *Science*, 237, 1154-1162). Uma função

30 biológica principal do NGF é a manutenção e a sobrevivência de neurônios pós-mitóticos, que o torna um candidato importante para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Além de sua função no desenvolvimento e na

manutenção das células neuronais, o NGF também tem efeitos significativos sobre as células não-neuronais. Assim, por exemplo, ele é um fator de sobrevivência autócrino para os linfócitos B (Torcia, M., et al., 1996, Cell, 85, 345-356).

5 O NGF gera sinais intracelulares por interação com duas classes de receptor de membrana: o produto protooncogênico de TrkA, p140^{trkA}, que tem atividade da tirosina cinase intrínseca, e um segundo receptor, p75^{NTR}, que pertence à família do receptor do fator de necrose tumoral (TNF). Nas células de câncer de mama, existem duas vias distintas de sinalização ativas pelo NGF. O efeito mitogênico requer o receptor p140^{trkA} e a cascata de MAP cinase, enquanto o efeito antiapoptótico depende do receptor p75^{NTR} e da ativação a jusante do fator NF-κB (S. Descamps, et al., 2001, acima mencionado). Assim, para a diagnose do câncer de mama, alguns autores voltaram-se para a detecção dos receptores de NGF, tal como, por exemplo, 10 no pedido de patente WO 94/06935, que descreve um método para a diagnose de um estado pré-canceroso ou canceroso em um paciente testando a quantidade de receptor de p75. 15

O efeito biológico intenso do NGF sobre as células de câncer de mama também formula a questão da sua distribuição na glândula mamária e da sua origem. É geralmente acreditado que o NGF seja produzido por alvos de inervação simpáticos e sensoriais, embora ele não tenha sido encontrado na corrente sanguínea (Bonini, S. et al., 1996, Proc., Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10955-10960). 20

A requerente agora demonstrou, surpreendentemente, que as células de câncer de mama, elas próprias, produzem NGF, enquanto que as células epiteliais mamárias normais correspondentes não produzem, de modo tal que o NGF pode ser usado como um marcador de tumor ou então como um alvo terapêutico. 25

Assim, um primeiro assunto da presente invenção é um método para a diagnose de câncer de mama por determinação da presença de NGF em amostras biológicas, derivadas de pacientes suspeitos de sofrerem de 30 câncer de mama.

O método da invenção, portanto, torna possível diagnosticar o câncer de mama por meio de um teste simples que consiste em pesquisar quanto à presença de NGF em uma amostra biológica tirada de um paciente. A requerente mostrou, inesperadamente, que as células de câncer produzem NGF, enquanto que as células não-cancerosas correspondentes são incapazes disto, conforme será demonstrado em maior detalhe nas partes que se seguem. Assim, a determinação da presença de NGF na amostra torna possível concluir que há uma patologia, uma ausência de NGF tornando possível concluir que não há nenhuma patologia.

10 A expressão "determinação da presença de NGF" é pretendida significar a detecção direta de NGF, ou o cultivo de células sensíveis ao NGF, ou a detecção de mRNA do NGF na amostra biológica, ou qualquer outro método para determinar a presença de uma proteína em uma amostra, conhecido para aqueles versados na técnica.

15 A determinação da presença de NGF por detecção direta de NGF constitui uma modalidade particular da invenção.

A expressão "detecção direta de NGF" é pretendida significar a demonstração de NGF propriamente dito na amostra biológica.

20 A detecção direta de NGF na amostra biológica pode ser realizada por qualquer meio conhecido para aqueles versados na técnica, por exemplo através de um imunensaio ou por espectrometria de massa, o que constitui uma modalidade particular da invenção.

O imunensaio pode ser qualquer ensaio amplamente conhecido para aqueles versados na técnica que envolva imunorreações, isto é, reações entre o NGF e um par para ligação ao NGF específico.

25 Os pares para ligação ao NGF específicos são qualquer par capaz de ligar-se ao NGF. Como exemplo, pode ser feita menção aos anticorpos, às frações dos anticorpos, aos receptores e a qualquer outra proteína capaz de ligar-se ao NGF.

30 Os anticorpos pares para ligação são os anticorpos policlonais ou os anticorpos monoclonais.

Os anticorpos policlonais podem ser obtidos por imunização de

um animal com o NGF, seguida por recuperação dos anticorpos desejados na forma purificada, retirando-se o soro do dito animal, e separação dos ditos anticorpos dos outros constituintes do soro, em particular através de cromatografia por afinidade sobre uma coluna à qual um antígeno está ligado, que é especificamente reconhecido pelos anticorpos, em particular o NGF.

Os anticorpos monoclonais podem ser obtidos pela técnica do hibridoma, cujo princípio geral é recordado abaixo.

Primeiramente, um animal, geralmente um camundongo (ou as células em cultura no caso de imunizações *in vitro*), é imunizado com o NGF, os linfócitos B do dito animal então sendo capazes de produzir anticorpos contra o dito antígeno. Estes linfócitos produtores de anticorpos são então fundidos com células de mieloma "imortais" (células de murino no exemplo) de modo a produzirem hibridomas. As células capazes de produzir um anticorpo específico e de multiplicarem-se indefinidamente são então selecionadas da mistura heterogênea das células assim obtida. Cada hibridoma é multiplicado na forma de um clone, cada um resultando na produção de um anticorpo monoclonal, cujas propriedades de reconhecimento com relação ao antígeno de tumor de interesse podem ser testadas, por exemplo, através de ELISA, por "immunoblot" mono- ou bidimensional, por imunofluorescência, ou por meio de um biossensor. Os anticorpos monoclonais assim selecionados são subsequenteiramente purificados, em particular de acordo com a técnica de cromatografia por afinidade descrita acima.

Os exemplos de anticorpos anti-NGF são conhecidos e estão disponíveis, em particular no catálogo da R&D Systems ou no catálogo da Santa Cruz.

Os pares para ligação ao NGF específicos podem ser marcados, a fim de revelar a ligação entre NGF/par para ligação quando o par para ligação for usado como um reagente de detecção, e, portanto, para a detecção direta do NGF na amostra biológica.

A expressão "marcação dos pares para ligação" é pretendida significar a ligação de uma marca capaz de gerar direta ou indiretamente um

sinal detectável. Uma lista não limitativa destas marcas consiste em:

- enzimas que produzem um sinal que pode ser detectado, por exemplo através de colorimetria, fluorescência ou luminescência, tais como a peroxidase da raiz forte, a fosfatase alcalina, a α -galactosidase ou a glicose-6-fosfato desidrogenase,
- cromóforos, tais como os compostos fluorescentes, luminescentes ou corantes,
- moléculas radioativas, tais como ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I , e
- moléculas fluorescentes, tais como alexa ou ficocianinas.

Os sistemas indiretos também podem ser usados, por exemplo os ligantes capazes de reagir com um antiligante. Os acoplamentos de ligante/antiligante são bastante conhecidos para aqueles versados na técnica, o qual é o caso, por exemplo, dos seguintes acoplamentos: biotina/estreptavidina, hapteno/anticorpo, antígeno/anticorpo, peptídeo/anticorpo, açúcar/lectina, polinucleotídeo/seqüência complementar ao polinucleotídeo. Neste caso, é o ligante que contém o agente de ligação. O antiligante pode ser diretamente detectável por meio das marcas descritas no parágrafo acima ou pode, ele próprio, ser detectável por meio de um ligante/antiligante.

Estes sistemas indiretos de detecção podem resultar, sob certas condições, em uma amplificação do sinal. Esta prática de amplificação do sinal é bastante conhecida para aqueles versados na técnica, e pode ser feita referência aos pedidos de patentes anteriores FR 98/10084 ou WO-A-95/08000 da requerente ou ao artigo J. Histochem. Cytochem. 45:481-491, 1997.

De acordo com o tipo de marcação do conjugado usado, aqueles versados na técnica adicionarão reagentes para a visualização da marcação.

Como forma de exemplo de imunoensaios como definidos acima, pode ser feita menção aos métodos de "sanduíche", tais como ELISA, IRMA e RIA, aos métodos de "competição", e aos métodos de imunodetecção direta, tais como a imunoistoquímica, a imunocitoquímica, o "Western blotting" e o "dot-blotting".

A espectrometria de massa também pode ser usada para a de-

tecção directa de NGF na amostra biológica. O princípio da espectrometria é amplamente conhecido para aqueles versados na técnica e é descrito, por exemplo, em S. Patterson, 2000, Mass spectrometry and proteomics. Physiological Genomics 2, 59-65.

5 Para efetuar isto, a amostra biológica, que pode ou não ter sido pré-tratada, é passada através de um espectrômetro de massa e o espectro obtido é comparado com aquele do NGF. Um exemplo de pré-tratamento da amostra consiste em passá-la sobre um suporte de imunocaptura contendo um dos pares para ligação ao NGF, por exemplo um anticorpo dirigido contra
10 o NGF.

 A amostra biológica usada para a detecção directa do NGF, provável de conter o NGF como tal, pode consistir em fluido biológico ou um tecido que se origina da biópsia do tumor ou das metástases do paciente sob consideração.

15 Para o fluido biológico, pode ser feita menção ao sangue, à medula óssea, ao leite, ao fluido cerebrospinal, à urina e às efusões.

 Para a detecção do NGF, o fluido biológico, o qual constitui uma modalidade particular da invenção, pode requerer um tratamento particular. Especificamente, o fluido biológico pode conter o NGF como tal, ou então ele
20 pode conter células de tumor circulantes que contenham o NGF, e possivelmente células de tumor circulantes que sejam capazes de secretar o NGF.

 Assim, de acordo com uma modalidade da invenção, o fluido biológico é pré-tratado a fim de isolar as células de tumor circulantes contidas no dito fluido.

25 A expressão "isolar as células de tumor circulantes" é pretendida significar obter uma fração celular enriquecida com células de tumor circulantes.

 O tratamento do fluido a fim de isolar as células de tumor circulantes pode ser realizado por separação das células em um citômetro de
30 fluxo, por enriquecimento sobre Ficoll, por enriquecimento com glóbulos magnéticos revestidos com anticorpos específicos, ou por qualquer outro método de enriquecimento específico, conhecido para aqueles versados na

técnica.

No caso de sangue ou de medula óssea como fluido biológico, as células de tumor circulantes podem ser isoladas por meio de uma técnica consistindo em separação das células em Ficoll associada com depleção das células sangüíneas usando anticorpos anti-CD45 acoplados a glóbulos magnéticos (Dynal Biotech ASA, Noruega).

A detecção direta do NGF pode então ser realizada diretamente usando células de tumor circulantes isoladas do fluido biológico, por exemplo através da marcação imunocitoquímica destas células com um anticorpo anti-NGF, após ter-se depositado a célula de tumor circulante sobre uma lâmina por citocentrífuga ("cytospin"). A detecção direta do NGF também pode ser realizada diretamente nas células de tumor circulantes usando o método de citometria de fluxo, como descrito em Métézéau P, Ronot X, Le Noan-Merdrignac G, Ratinaud MH, La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique [Citometria de fluxo para estudar as células normais ou patológicas] (Volume I), editores Medsi-MacGrawhill.

Sob estas condições, as ditas células circulantes podem ser tratadas sob condições que bloqueiam o NGF dentro das ditas células. Um tal tratamento é descrito, por exemplo, em Intracellular Flow Cytometry, Applied reagents and Techniques, pp. 1-21, BD Pharmingen.

A detecção do NGF é então realizada após ter tornado a membrana da célula permeável, de modo a fazer com que os pares para ligação ao NGF específicos entrem.

A detecção direta do NGF usando células circulantes também pode ser realizada por meio do método descrito no pedido de patente WO 03/076942, depositado por uma das requerentes.

A detecção direta do NGF nas células de tumor também pode ser realizada no meio de cultura das ditas células após tê-las cultivado sob condições tais que elas secretem o NGF.

Estas condições de cultura são condições convencionais, tais como 37°C em uma atmosfera úmida e a 5% de CO₂.

Quando a amostra biológica a ser testada for um tecido que se

origina da biópsia do tumor ou das metástases do paciente, o que constitui uma modalidade particular da invenção, a detecção direta do NGF é realizada diretamente sobre as secções obtidas, sem pré-tratamento do dito tecido.

Um outro método para detectar a presença de NGF consiste em cultivar as células sensíveis ao NGF na presença da amostra biológica, o que constitui uma modalidade particular da invenção.

Neste caso, a detecção da presença de NGF em uma amostra biológica é demonstrada por meio da reação das células sensíveis ao NGF.

O termo "células sensíveis ao NGF" é pretendido significar qualquer célula que seja estimulada na presença do NGF (crescimento, apoptose, etc.).

Para as células sensíveis ao NGF, pode ser feita menção às células de feocromocitoma PC12 (Hondermarck H. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:9377-81) e às células embriônicas de origem neuronal (Hattori A., et al., 1994, J. Biol. Chem., 268:2577-2582).

A amostra biológica que pode ser usada para detectar a presença de NGF por cultivo das células sensíveis ao NGF pode ser qualquer amostra como descrita acima.

Assim, a amostra biológica pode consistir em fluido biológico, onde apropriado, pré-tratado a fim de isolar as células de tumor circulantes, as quais podem, elas próprias, então ser cultivadas sob condições tais que elas secretem o NGF, como descrito acima.

Um outro método para detectar a presença de NGF nas amostras biológicas consiste em detectar o mRNA do NGF na dita amostra, o que constitui uma outra modalidade da invenção.

A detecção do mRNA em uma amostra líquida é amplamente conhecida para aqueles versados na técnica.

Ela pode, por exemplo, ser realizada por meio de reações de hibridização entre o mRNA alvo e um ácido nucléico capaz de ligar-se com o mRNA alvo.

O termo "ácido nucléico" é pretendido significar os oligonucleotídeos, os ácidos desoxirribonucleicos e os ácidos ribonucleicos, e também os

derivados destes.

O termo "oligonucleotídeo" significa uma cadeia de pelo menos 2 nucleotídeos naturais ou modificados (desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, ou ambos) capazes de hibridizar, sob condições apropriadas de hibridização, com um oligonucleotídeo que é pelo menos parcialmente complementar. O termo "nucleotídeo modificado" é pretendido significar, por exemplo, um nucleotídeo contendo uma base modificada e/ou contendo uma modificação no nível da ligação entre nucleotídeos e/ou no nível da cadeia principal. Como forma de exemplo de bases modificadas, pode ser feita menção à inosina, à metil-5-desoxicitidina, à dimetilamino-5-desoxiuridina, à diamino-2,6-purina e à bromo-5-desoxiuridina. Para ilustração de uma ligação entre nucleotídeos modificada, pode ser feita menção às ligações de fosforotioato, N-alquilfosforamidato, fosfonato de alquila e fosfodíéster alquílico. Os alfa-oligonucleotídeos, tais como aqueles descritos em FR-A-2 607 507, os LNAs, tais como os fosforotioato-LNAs e os 2'-tio-LNAs descritos em Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 8, Publicação 16, 18 de agosto de 1998, páginas 2219-2222, e os PNAs que são o assunto do artigo de M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897, são exemplos de oligonucleotídeos consistindo em nucleotídeos cuja cadeia principal está modificada.

As reações de hibridização podem ser visualizadas por marcação dos ácidos nucléicos de ligação, como ilustrado acima.

Antes da hibridização com o ácido nucléico de ligação, o mRNA alvo pode ser extraído por métodos conhecidos para aqueles versados na técnica, e então opcionalmente amplificado, por exemplo, através de RT-PCR ou por NASBA (Maleck, L., et al., 1994, Methods in Molecular Biology, 28, Cap. 36, Ed P.G. Isaac, Humana Press, Inc., Totowa, NJ).

A amostra biológica que pode ser usada para detectar a presença de NGF por detecção do mRNA do NGF pode ser qualquer amostra como descrita acima.

Assim, a amostra biológica pode consistir em tecido derivado de uma biópsia do tumor ou uma biópsia das metástases, ou então de fluido

biológico, onde apropriado, pré-tratado a fim de isolar as células de tumor circulantes, conforme descrito acima.

O método da invenção pode ser usado tanto para a diagnose precoce quanto para o exame, o acompanhamento terapêutico, o prognóstico e a diagnose de recorrência no caso de câncer de mama, visto que somente as células de câncer produzem NGF e esta produção depende do grau do câncer.

Desse modo, um outro assunto da invenção consiste no uso do método da invenção em diagnose precoce, exame, acompanhamento terapêutico, prognóstico e na diagnose de recorrência no caso de câncer de mama.

Além da função como um marcador de tumor, o NGF pode também ter uma função como um alvo terapêutico. Na realidade, devido à capacidade das células de câncer de mama de produzirem NGF, enquanto que as células normais não produzem, a proliferação do tumor e a disseminação distante das células de câncer de mama podem ser bloqueadas por meio de um par para ligação ao NGF capaz de bloquear a proliferação das células, ou por meio de um inibidor do NGF.

Os pares para ligação ao NGF e os inibidores do NGF podem, portanto, ser usados como produtos medicinais.

Assim, um assunto da presente invenção é também o uso de um par para ligação ao NGF ou de um inibidor do NGF para preparar um produto medicinal, sendo entendido que, no caso do câncer, os pares para ligação ao NGF não são receptores para o NGF ou fragmentos ativos destes receptores.

De acordo com uma modalidade particular da invenção, o dito produto medicinal é útil para bloquear a proliferação do tumor e a disseminação distante em pacientes sofrendo de câncer de mama.

As composições farmacêuticas compreendendo, como princípio ativo, pelo menos um par para ligação ao NGF ou um inibidor do NGF, opcionalmente combinado com um excipiente farmacêuticamente aceitável, estão também incluídas na invenção, sendo entendido que, no caso do câncer,

os pares para ligação ao NGF não são receptores para o NGF ou fragmentos ativos destes receptores.

As composições farmacêuticas que são úteis contra o câncer de mama compreendem, como princípio ativo, pelo menos um par para ligação
5 ao NGF capaz de bloquear a proliferação das células de tumor, ou um inibidor do NGF.

Os pares para ligação ao NGF específicos, que são adequados como um princípio ativo, são, em particular, como definidos acima nos imunoensaios, e podem ser qualquer outro par conhecido para aqueles ver-
10 sados na técnica capaz de bloquear a proliferação do tumor. De acordo com uma modalidade particular, o par específico capaz de bloquear a proliferação das células de câncer de mama é um anticorpo anti-NGF.

O termo "inibidor do NGF" é pretendido significar os inibidores diretos do NGF, isto é, os inibidores que bloqueiam a atividade biológica da
15 proteína, os inibidores das vias de exocitose para o NGF, os inibidores do mRNA do NGF, e os inibidores do gene codificando o NGF.

Como um inibidor direto do NGF, pode ser feita menção ao inibidor K-252a (Tapley, P., et al., 1992, Oncogene 7, 371-381).

Os inibidores das vias de exocitose para as proteínas, e em particular para o NGF, são amplamente conhecidos para aqueles versados na
20 técnica.

Como um inibidor do mRNA do NGF, pode ser usado um fragmento sintético deste mRNA. Especificamente, a tecnologia do RNA de interferência é baseada no uso de um oligonucleotídeo de RNA de fita dupla
25 correspondendo a uma sequência curta do mRNA celular a ser inibido. Este oligonucleotídeo duplex (possivelmente introduzido em um plasmídeo), após entrar na célula, é processado pelo sistema enzimático Dicer/Risc, o que resultará na degradação do mRNA celular correspondente (Dykxhoorn D et al., 2003, Nature Review, Vol. 4, págs. 457-467).

30 Como um inibidor do gene codificando o NGF, pode ser feita menção a um oligonucleotídeo sem sentido de NGF. Este oligonucleotídeo pode ser prontamente preparado por aqueles versados na técnica.

A fim de objetivar a ação terapêutica dos pares para ligação ao NGF ou dos diversos inibidores, eles podem ser colocados sob condições tais que eles entrem especificamente nas células de interesse, tais como as células de tumor, o que constitui uma outra modalidade da invenção.

5 Com referência a isto, eles podem, por exemplo, ser ligados a um par que permita uma tal entrada, por exemplo uma molécula veículo, um polímero, tal como os polímeros usados na terapia genética, ou então um vetor viral, tal como os adenovírus e os poxvírus, também usados na terapia genética.

10 Por exemplo, no caso do câncer de mama, a molécula veículo pode ser um anticorpo anti-MUC1 ou um anticorpo anticélula epitelial, ou alternativamente um anticorpo anti-HER-2/neu.

De preferência, quando a composição farmacêutica compreender, como princípio ativo, um par para ligação ao NGF ou um inibidor do NGF, tal como um inibidor direto ou um inibidor das vias de exocitose para o NGF, estes são colocados sob condições tais que eles especificamente entram nas células de tumor de interesse, os inibidores do mRNA do NGF e os inibidores do gene codificando o NGF tendo a capacidade de entrar naturalmente nas ditas células.

20 A quantidade e a natureza do excipiente podem ser prontamente determinadas por aqueles versados na técnica. Elas são escolhidas de acordo com a forma farmacêutica e o método de administração desejado.

Nas composições farmacêuticas da invenção para a administração oral, sublingual, subcutânea, intramuscular, intratumor, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica, retal, intra-ocular ou intra-auricular, o dito princípio ativo pode ser administrado em uma forma de administração unitária.

25 As formas de administração unitárias podem, por exemplo, ser comprimidos, cápsulas gelatinosas, grânulos, pós, soluções ou suspensões orais injetáveis, emplastros transdérmicos, formas de administração sublinguais, bucais, intratraqueais, intra-oculares, intranasais ou intra-auriculares, formas de administração por inalação, formas de administração tópicas,

transdérmicas, subcutâneas, intramusculares, intratumores ou intravenosas, formas de administração retais, ou implantes. Para a administração tópica, podem ser considerados os cremes, os géis, os ungüentos, as loções ou as loções para os olhos.

- 5 Estas formas farmacêuticas são preparadas de acordo com os métodos usuais nos campos sob consideração.

As ditas formas unitárias contêm uma dosagem de modo a possibilitar a administração diária de 0,001 a 10 mg de princípio ativo por kg de peso do corpo, de acordo com a forma farmacêutica.

- 10 Podem existir casos particulares onde sejam apropriadas dosagens maiores ou menores; tais dosagens não se afastam do contexto da invenção. De acordo com a prática usual, a dose apropriada para cada paciente é determinada pelo médico em conformidade com o método de administração e o peso e a resposta do paciente.

- 15 De acordo com uma outra modalidade, a presente invenção também se refere-se a um método de tratar o câncer de mama, o qual compreende a administração, a um paciente, de uma dose eficaz de um par para ligação ao NGF ou de um inibidor do NGF.

- 20 A invenção será entendida mais claramente a partir dos seguintes exemplos, dados como forma de ilustração não limitativa, e também a partir das figuras 1 a 5 em anexo, nas quais:

- a figura 1 diz respeito às representações na forma de gráficos que se relacionam à demonstração da expressão do NGF em células de câncer, na qual:
- 25 • a figura 1A representa um gel de eletroforese demonstrando, após RT-PCR, a secreção de NGF pelas células de câncer MCF-7, T47D, MDA-MB-231 e BT20 e pelas células da glândula submaxilar como um controle, e também a ausência de uma tal secreção pelas células normais NBEC (Células Epiteliais da Mama Normais),
- 30 • a figura 1B representa um gel de eletroforese demonstrando, após "imunoblotting", a secreção de NGF pelas células de câncer MCF-7, T47D, MDA-MB-231 e BT20 e pelas células da glândula submaxilar, e também a

ausência de uma tal secreção pelas células NBEC, e

- a figura 1C é um gráfico dando a quantidade de NGF secretado como uma função das células testadas por ELISA, isto é, as células de câncer MCF-7, T47D, MDA-MB-231 e BT20, as células da glândula submaxilar e as células NBEC,

- a figura 2 diz respeito às representações que se relacionam à co-cultura de células de câncer e de células sensíveis ao NGF, na qual:

- a figura 2A representa o esquema experimental para o co-cultivo das células PC12 (1) que se desenvolvem na presença de NGF e de células de câncer (2), e

- a figura 2B consiste em fotografias representando o cultivo de células PC12 como um controle (fotografia 2), a diferenciação das células PC12 sob a influência do NGF (fotografia 3), o co-cultivo das células sensíveis ao NGF na presença das células de câncer MCF-7 (fotografia 4), o cultivo das células de câncer MCF-7 na presença de um anticorpo anti-NGF (fotografia 5), o cultivo das células de câncer MCF-7 na presença do inibidor K252a (fotografia 6), e o cultivo das células mamárias normais NBEC (fotografia 7),

- a figura 3 representa fotografias da imunocitoquímica demonstrando a expressão do NGF por imunodeteção em tecido derivado de biópsia, na qual as fotografias A e B relacionam-se ao tecido normal, respectivamente com ou sem marcação de NGF, as fotografias C a F relacionam-se ao tecido canceroso, as fotografias C e E relacionam-se às secções sem a marcação de NGF (controle negativo) e as fotografias D e F relacionam-se às secções com marcação de NGF,

- a figura 4 relaciona-se aos gráficos demonstrando a influência, sobre o crescimento da célula, de um par para ligação capaz de bloquear a proliferação das células de câncer de mama, na qual:

- a figura 4A representa um gráfico mostrando o crescimento das células MCF-7 como o número de células (10^4 células/disco de 35 mm), ou sem o agente para bloquear a proliferação do tumor, como um controle, ou na presença do anticorpo anti-NGF MAB-256, ou na presença do inibidor K-252a, e

- as figuras 4B e 4C representam gráficos dando o número de células MCF-7 como uma função da dose do anticorpo MAB-256 (figura 4B) ou da dose do inibidor K-252a (figura 4C), e
- a figura 5 fornece gráficos que demonstram a influência de um anticorpo anti-NGF, como uma função do tempo, sobre o volume do tumor (figura 5A), sobre a massa do tumor (figura 5B) e sobre o número de metástases do fígado (figura 5C) de células de câncer de mama de camundongos.

Exemplo 1: Demonstração da expressão do NGF em células de câncer de mama por RT-PCR

1.1 Células testadas

Quatro linhagens de células de câncer de mama humanas foram testadas, isto é, as células MCF-7, T47D, MDA-MB-231 e BT20, obtidas da coleta ATCC (Rockville, MD) sob os números HTB-22, HTB-133, HTB-26 e HBT-29, respectivamente.

Estas células foram mantidas em meio essencial mínimo (sais de Earle, BioWhittaker, Bélgica) suplementado com Hepes a 20 mM, 2 g/l de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 10% de soro de bezerro fetal (FCS), 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina, 50 µg/ml de gentamicina, 1% de aminoácidos não essenciais e 5 µg/ml de insulina.

Para comparação, foram testadas células epiteliais de mama normais (NBEC), obtidas do Departamento de Cirurgia Plástica da Universidade Médica de Lille (Professor Pellerin, França), que foram cultivadas em meio DMEM/F12 (1/1) (BioWhittaker) contendo 5% de FCS, 10 IU/ml de insulina, 5 µM de cortisol, 2 ng/ml de EGF, 100 ng/ml de toxina da cólera, 100 ng/ml de penicilina e 45 µg/ml de gentamicina (meio B1). Quando as células aproximaram da confluência, elas foram colocadas no mesmo meio, exceto que a concentração de cálcio foi diminuída para 20 µM.

As células da glândula submaxilar humanas, obtidas de resíduos de dissecação hospitalares, foram também usadas como uma fonte conhecida de NGF.

1.2 RT-PCR

O RNA total foi isolado das linhagens de células de câncer, das células NBEC e das células da glândula submaxilar humanas (20 mg por peso) usando o mini kit Rneasy (Qiagen, França). A glândula submaxilar foi rompida e homogeneizada usando um homogeneizador de Rotor-Estator (Bribolyser, Hybaid).

A quantidade de RNA extraído foi quantificada medindo a absorvância a 260 nm, e a pureza do RNA foi investigada por meio da razão de absorvância a 260 nm para absorvância a 280 nm. A ausência de degradação do RNA foi confirmada por eletroforese do RNA sobre um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio.

A transcrição reversa (RT) foi realizada adicionando uma mistura de reação contendo 2 g de mRNA total purificado, 1X tampão de reação, 10 mM de DTT, 400 mM de dNTP para cada, 2,5 M de oligo(dT), 40 unidades de Rnasin e 200 unidades de transcritase reversa de vírus da leucemia de murino Moloney, com um volume total de reação de 25 µl. Todas as reações foram incubadas a 37°C por 1 h, e então inativadas a 95°C por 5 min.

A PCR foi realizada sobre os cDNAs após a RT ou sobre as amostras de RNA sem a etapa de RT para os controles negativos, como se segue:

Foram adicionados aos tubos de PCR 5 µl de tampão de PCR (200 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM de KCl), 10 µl de 15 mM de MgCl₂, 1 ml de 10 mM de mistura de dNTP, 1 µl de cDNA ou de mRNA total (para o controle negativo), 1 µl de 50 mM das sondas para o gene *ngf* indicadas abaixo, 1 µl de 2,5 unidades/µl de Taq DNA polimerase e água até um volume total de 50 µl.

Sonda com sentido: 5'-GACAGTGTCAGCGTGTGGGTT-3'

Sonda sem sentido: 5'-CCCAACACCATCACCTCCTT-3'.

As condições da PCR eram como se segue: após tratamento a 95°C por 3 min para desnaturar o cDNA, foram efetuados 30 ciclos consistindo em 94°C por 1 min, 57°C por 2 min e 72°C por 3 min. Os tubos de PCR foram então incubados por uns 10 min adicionais a 72°C para a extensão

dos fragmentos de cDNA após o ciclo final.

A visualização do material amplificado sob luz UV por meio de coloração com brometo de etídio, após a eletroforese em gel de agarose, é representada na figura 1A. Esta figura mostra um produto de transcrição de *ngf* de 74 bp para as células epiteliais cancerosas e as células da glândula submaxilar (controle positivo), enquanto que este produto não é detectado para as células NBEC.

Este teste, portanto, torna possível demonstrar que as células cancerosas secretam NGF, ao passo que as células epiteliais não-cancerosas correspondentes não o secretam.

Exemplo 2: Demonstração da expressão do NGF em células de câncer de mama por "immunoblotting"

2.1 Células testadas

As células testadas são aquelas indicadas no ponto 1.1. acima mencionado.

2.2 "Immunoblotting"

As células subconfluentes, cultivadas conforme indicado no ponto 1.1 acima, foram enxaguadas e colocadas em um meio sem soro contendo fibronectina e transferrina por 24 h. Após as células terem sido privadas de nutrientes, elas foram coletadas por raspagem em um tampão de PBS (solução de salina tamponada com fosfato) e foram submetidas à centrifugação ($1000 \times g$, 5 min).

A pelota foi tratada com tampão de lise (100% de SDS, 0,5% de β -mercaptoetanol, 0,5 M de Tris HCl, pH 6,8, 25% de glicerol, 0,5%) e a mistura foi fervida por 5 min a 100°C.

Após centrifugação ($1000 \times g$, 5 min), as proteínas nos sobrenadantes foram investigadas usando os ensaios de determinação de proteínas da Bio Rad.

Os lisados que se originaram de cada linhagem de células e da glândula submaxilar foram submetidos à SDS-PAGE e foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose por eletrotransferência (200 mA, 45 min).

Cada membrana foi então testada com um anticorpo policlonal de coelho anti-NGF (sc-548, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, França) a 4°C, durante a noite. Cada membrana foi enxaguada três vezes com tampão TSB-T, e foi então incubada na temperatura ambiente, por 2 h, com um anti-

5 corpo antiimunoglobulina de coelho acoplado à peroxidase da raiz forte (Molecular Probes). Cada membrana foi enxaguada quatro vezes com tampão de TBS-T e a reação foi visualizada usando o kit de quimioluminescência ECL (Amersham Pharmacia Biotech) com o filme X-Omat AR da Kodak.

Aqui novamente, conforme representado na figura 1B, o NGF foi

10 detectado com as células cancerosas e a glândula submaxilar (banda em 14 kDa), enquanto que esta banda estava ausente para as células não-cancerosas.

Este resultado confirma aquele do exemplo 1.

15 **Exemplo 3: Demonstração da expressão do NGF em células de câncer de mama por ELISA**

3.1 Células testadas

As células testadas são aquelas indicadas no ponto 1.1. acima descrito.

3.2 ELISA

20 Para este ensaio, foi usado um ensaio de dois locais para o β -NGF humano. Em resumo, as imunoplaacas foram revestidas com 1 μ g/ml de anticorpo de captura monoclonal (R&D Systems, UK) diluído em um tampão de diluição (0,1% de BSA, 0,005% de Tween 20 em uma solução de salina tamponada com Tris, pH 7,3). Os poços de controle foram revestidos com a

25 mesma quantidade de IgG de camundongo (R&D Systems). Cada poço recebeu 100 μ l desta diluição e as placas foram vedadas e incubadas na temperatura ambiente, durante a noite.

Os poços foram lavados três vezes com 400 μ l de PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20. As placas foram então bloqueadas na tempe-

30 ratura ambiente, usando 1% de soro albumina bovino, 5% de sacarose e 0,005% de NaN_3 no mesmo tampão.

Após 2 h, cada poço foi lavado, foram adicionadas diluições de

produtos desconhecidos e padrões em um volume de 100 μ l, e as placas foram recobertas com uma fita adesiva e foram incubadas na temperatura ambiente, durante a noite.

O β -NGF humano (R&D Systems) foi usado como uma amostra padrão, em uma proporção de 0,25 a 8 ng/ml em 100 μ l de tampão de diluição.

As placas foram então lavadas completamente e o anticorpo de detecção de IgG de cabra anti- β -NGF humano específico (BAF-256, R&D Systems) foi adicionado em uma proporção de 50 ng/ml, antes da incubação por 2 h na temperatura ambiente.

Após a incubação, as imunoplasacas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e 100 μ l de estreptavidina/peroxidase da raiz forte foram adicionados para uma incubação de 20 min na temperatura ambiente.

A reação começou com a adição de 100 μ l de uma solução de substrato para uma incubação de 30 min na temperatura ambiente e no escuro.

Após este período, 50 μ l de uma solução de interrupção (H_2SO_4 a 1M) foram adicionados a cada poço. A densidade óptica foi determinada em 30 min, usando uma montagem de leitora de microplaca a 595 ou 450 nm.

Os resultados da densidade óptica (média após três ensaios independentes) são dados na figura 1C. Eles demonstram um nível similar de NGF em todas as linhagens de células de câncer de mama testadas.

Exemplo 4: Cultivo das células sensíveis ao NGF

Para realizar isto, as células que se desenvolvem na presença de NGF, isto é as células PC12, foram co-cultivadas com as células de câncer de mama MCF-7, conforme descrito no ponto 1.1 acima, ou então com as células NBEC, conforme descrito no ponto 1.1 acima, como um controle.

As células PC12 foram cultivadas de antemão a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 , em meio essencial mínimo modificado da Dulbecco (DMEM), suplementado com 3 g/l de bicarbonato de sódio, 4 mM de L-glutamina, 10% de soro de bezerro fetal, 5% de soro de cavalo e 100 unida-

des/ml de penicilina/estreptomicina.

O co-cultivo foi realizado com placas de policarbonato tratadas com cultura de tecido Transwell® (12 mm de diâmetro e 12 µm de tamanho de poro). Um período de equilíbrio inicial foi observado por adição do meio ao poço central da placa, e então ao inserto de Transwell®, cuja operação foi seguida por incubação a 37°C por 3 h.

As células PC12 foram semeadas em placas com 12 poços revestidas com colágeno, por 24 h, a fim de assegurar a ligação correta às placas de cultura. As células MCF-7 ou NCBE foram semeadas dentro do inserto de Transwell®, correspondendo ao compartimento superior, no meio completo, por 24 h.

Após este tempo, cada linhagem de células foi enxaguada três vezes com meio sem soro e foi incubada em um meio de supressão. Nas experiências de controle, o meio foi suplementado com meio contendo ou o NGF, ou um inibidor da atividade da tirosina cinase trk (K-252-a, Calbiochem, França), ou um anticorpo monoclonal de camundongo anti-β-NGF humano (MAB-256, R&D Systems).

O co-cultivo foi realizado por 48 h. Após este período, as células PC12 foram fixadas com metanol gelado (-20°C) por 20 min e então lavadas com uma solução de salina tamponada com fosfato (PBS) antes da montagem com tiras de cobertura e Glycergel (Dako, França).

A percentagem de células contendo neuritos, definidas como células com uma ou mais extensões de neuritos duas vezes o comprimento do corpo das células, foi contada. As fotomicrografias foram também tiradas usando um microscópio de contraste de fases equipado com uma câmera digital óptica Olympus.

Os resultados são dados na figura 2, na qual:

- a figura 2A mostra o esquema experimental onde (2) corresponde às células cancerosas ou não-cancerosas e (1) corresponde às células PC12,

- a figura 2B proporciona fotografias onde:

• as fotografias 2 e 3 mostram a cultura das células PC12 como um

controle, respectivamente sem o NGF e na presença do NGF, onde é observado o desenvolvimento de neuritos devido à diferenciação,

- a fotografia 4, que se relaciona ao co-cultivo das células MCF-7 e PC12, mostra que as células PC12 são diferenciadas após 48 h de cultura,
- 5 • a fotografia 5, que se relaciona ao co-cultivo das células MCF-7 e PC12 na presença do anticorpo anti-NGF, mostra uma forte inibição da diferenciação das células PC12 devido ao anticorpo,
- a fotografia 6, que se relaciona ao co-cultivo das células MCF-7 e PC12 na presença do inibidor K-252a, mostra uma forte inibição da diferenciação das células PC12 devido ao inibidor, e
- 10 • a fotografia 7, que se relaciona ao co-cultivo das células NBEC normais e das células PC12, demonstra a ausência de diferenciação das células PC12.

15 **Exemplo 5: Imunoistoquímica para a detecção do NGF em biópsias de câncer de mama**

5.1 Amostragem e fixação das biópsias

Imediatamente após a operação, as biópsias do tecido de câncer de mama humano ou de tecido normal não-canceroso (controle) foram fixadas com uma solução de formol a 10% por 24 horas. Após desidratação com

20 banhos de álcool progressivos (30 até 100%), as amostras foram encerradas em parafina. As secções foram cortadas sobre um micrótomo (secção fina de 5 micrômetros), e então fixadas sobre lâminas revestidas com 3-aminopropiltrietoxissilano (TESPA, Dako, França).

5.2 Desparafinação das lâminas

25 As lâminas foram desparafinadas embebendo-as em banhos de acordo com o seguinte procedimento:

- 2 banhos de tolueno (10 min),
- 1 banho de álcool a 100% (10 min),
- 1 banho de álcool a 95% (10 min),
- 30 - 1 banho de álcool a 70% (10 min),
- 1 banho de água (10 min).

As lâminas foram então armazenadas a +4°C.

5.3 Marcação de NGF

As secções foram enxaguadas com TBS-0,1% de Tween (TBS: 17,54 g de NaCl, 2,42 g de Trisbase, qs 2 litros de água, pH 7,4) por 10 min, com agitação. Os antígenos foram reativados com tampão de citrato a 0,01M (1,05 g de monoidrato de ácido cítrico, qs 500 ml de água destilada, pH 6 (NaOH)) por 5 min, 2 vezes em um banho de água a 95°C. As lâminas foram incubadas por 5 min, com agitação, em 3% de peróxido de hidrogênio aquoso/TBS. As lâminas foram saturadas por uma hora na temperatura ambiente em TBS/3% de BSA.

10 As lâminas foram então incubadas por 2 h na temperatura ambiente, em uma câmara úmida, com 80 µl de anticorpos primários anti-NGF (Santa Cruz, Tebu, França), diluídas para 1/50 em TBS/3% de BSA. Elas foram lavadas 3 vezes em TBS/Tween por 5 min, com agitação.

15 As lâminas foram então incubadas novamente, por 2 h na temperatura ambiente, em uma câmara úmida, com 80 µl de anticorpo secundário de macaco anti-IgG de coelho, o dito anticorpo tendo sido ligado à peroxidase da raiz forte (Jackson Laboratories, US), diluídas para 1/100 em TBS/3% de BSA.

20 As lâminas foram lavadas três vezes em TBS/Tween por 5 min, com agitação, enxaguadas três vezes com PBS por 5 min, com agitação, secadas, e então incubadas por 10 min com 100 µl de DAB (3,3-diaminobenzidina resistente sigma; 1 comprimido de DAB + 1 comprimido de H₂O₂/uréia em 1 ml de água).

25 A coloração foi verificada sob um microscópio e interrompida em um banho de PBS. Uma contracoloração foi efetuada a fim de visualizar as estruturas mamárias, por imersão em hematoxilina de Harris em solução modificada (Sigma) por 4 s. O enxágüe foi realizado em água alcalina e então em um banho de PBS.

30 A lâmina foi montada sobre glycergel aquecido em um banho de água a 50°C.

As lâminas foram fotografadas por meio de uma lente de aumento binocular (Zeiss).

As fotografias da imunoistoquímica sobre as secções assim obtidas são representadas na figura 3. As fotografias A e B relacionam-se ao tecido normal, respectivamente com ou sem a marcação de NGF. As fotografias C a F relacionam-se ao tecido canceroso, as fotografias C e E relacionam-se às secções sem a marcação de NGF (controle negativo) e as fotografias D e F relacionam-se às secções com a marcação de NGF. A barra de tamanho representa 250 micrômetros para as fotografias A, B, E e F ou 600 micrômetros para as fotografias C e D.

Os resultados claramente mostram que o NGF é detectado por imunoistoquímica sobre lâminas de biópsias, nas células epiteliais de câncer de mama, porém não nas células epiteliais mamárias normais (células epiteliais marcadas com o anticorpo anti-NGF, e, como um resultado, tingidas, nas glândulas mamárias tumorais em D e F comparados com C e E, e não nas glândulas mamárias normais em B comparado com A).

Exemplo 6: Detecção do NGF nas células de tumor por citometria de fluxo

As células MCF-7 foram separadas por raspagem do fundo da placa de cultura. 100 µl de fixador (Coulter) foram então adicionados, com incubação por 15 minutos na temperatura ambiente. As células foram então lavadas três vezes com PBS e centrifugadas a 1900 rpm por 5 minutos.

100 µl de permeabilizador (Coulter) foram adicionados, e então a incubação foi realizada por 5 minutos, na temperatura ambiente.

20 µl do anticorpo monoclonal de camundongo anti-NGF não marcado (R&D Systems, diluído para 1/100) foram adicionados e então a incubação foi efetuada por 15 minutos, na temperatura ambiente.

As células foram então lavadas três vezes com PBS e centrifugadas a 1900 rpm por 5 minutos.

20 µl do anticorpo secundário anticamundongo marcado com FITC (R&D Systems, diluído para 1/50) foram adicionados e então a incubação foi realizada por 15 minutos na temperatura ambiente e no escuro.

As células foram então lavadas três vezes com PBS e centrifugadas a 1900 rpm por 5 minutos.

As células foram absorvidas em 500 µl de PBS e então a leitura foi efetuada com um citômetro de fluxo (Coulter® EPICS® da Beckman).

Os resultados obtidos mostram que mais do que 30% das células desta linhagem de células contêm NGF intracitoplásmico.

5 Um tal método é aplicável com células de tumor isoladas de uma amostra biológica.

Exemplo 7: Influência de um anticorpo anti-NGF e de um inibidor farmacológico sobre o crescimento das células de câncer

10 Foi estudado o efeito do anticorpo de bloqueio MAB-256 (acima descrito) e do inibidor K-252a sobre o crescimento das células MCF-7. Para efetuar isto, as células foram semeadas em uma proporção de 2×10^4 células/ml em placas de 35 mm, em meio completo. Após terem atingido 40% de confluência, as células foram lavadas duas vezes e foram deixadas sem nutrientes em um meio sem soro contendo fibronectina (2 µg/ml) e transferrina
15 (30 µg/ml) por 3 h. Na hora seguinte, o meio foi substituído com 2 ml do mesmo meio contendo o inibidor K-252a ou o anticorpo MAB-26 em concentrações variadas, a fim de estudar o efeito do inibidor farmacológico ou do inibidor de bloqueio sobre o nível de crescimento da linha de base.

20 Após tratamento por 24, 36, 48 e 72 h, o número de células foi determinado, após tripsinização da cultura de monocamada com uma solução de 0,25% de tripsina/EDTA, usando um hemocítômetro.

Um anticorpo monoclonal anticamundongo (A4700, Sigma), isto é, um anticorpo irrelevante, foi também usado a fim de determinar a especificidade do anticorpo de bloqueio.

25 Os resultados são dados na figura 4, na qual:
- a figura 4A mostra que o crescimento das células MCF-7 em meio básico (quadrados) diminui na presença do anticorpo (triângulos) e do inibidor (losangos).
- as figuras 4B e 4C mostram que há um efeito da dose do anticorpo e do inibidor, respectivamente, sobre o efeito proliferativo do NGF para
30 as células cancerosas.

O NGF pode, portanto, de fato ser usado como um alvo terapêu-



tico.

Exemplo 8: Efeito dos anticorpos anti-NGF sobre a tumorigênese das células mamárias *in vivo*

5 O crescimento das células de câncer de mama MDA-MB-231 foi estudado como se segue:

30 camundongos SCID (Imunodeficiência Combinada Grave) receberam uma injeção subcutânea no flanco, no tempo 0 (D0), de 3×10^6 células MDA-MB-231, derivadas de culturas *in vitro*, e 50 microlitros de PBS por camundongo. Os camundongos foram mantidos sob condições de colô-
10 nia de reprodução padrão na temperatura ambiente, com alternância de dia/noite e acesso ilimitado ao alimento e à bebida.

Quatorze, 21 e 28 dias após a injeção das células, metade dos camundongos foi injetada com os anticorpos de bloqueio anti-NGF humano (Oncogene Research Product, VWR França) na periferia do tumor (subcutâ-
15 neo no flanco, 1 cm a partir do ponto de injeção das células de tumor), na concentração de 12,5 microgramas em 50 microlitros de tampão de PBS por camundongo.

O tamanho do tumor foi medido sobre os camundongos vivos, tratados com o anticorpo anti-NGF ou não tratados, usando um medidor de
20 lâmina eletrônico, 21 e 35 dias após a injeção das células de câncer (D21 e D35, respectivamente). O volume do tumor foi calculado com a seguinte fórmula: $0,5236 \times \text{comprimento (mm)} \times \text{largura (mm)} \times (\text{comprimento} + \text{largura})/2$.

O peso dos tumores em D35 foi também medido sobre estes
25 mesmos camundongos, após o animal ter sido sacrificado, usando uma balança de precisão eletrônica.

Finalmente, o número de metástases no seu fígado foi contado macroscopicamente.

Os resultados respectivos das medições acima (média) são da-
30 dos sobre os gráficos na figura 5, onde o histograma riscado corresponde aos camundongos não tratados com o anticorpo anti-NGF (controles) e o histograma não preenchido corresponde aos camundongos tratados com o

dito anticorpo.

Estes gráficos demonstram que os tratamentos com um anti-NGF resultam em uma diminuição na massa e no volume do tumor, e também no número de metástases no caso de câncer de mama.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a diagnose *in vitro* de câncer de mama, caracterizado pelo fato de que consiste em determinar a presença de NGF em uma amostra biológica derivada de um paciente suspeito de sofrer de câncer de mama.
5
2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a presença do NGF é demonstrada por detecção direta do NGF na dita amostra biológica.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a detecção do NGF é realizada por meio de um imunoensaio ou por espectrometria de massas.
10
4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 e 3, caracterizado pelo fato de que a dita amostra biológica consiste em fluido biológico ou em um tecido que se origina da biópsia do tumor ou de metástases.
15
5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica consiste em um tecido que se origina da biópsia do tumor ou das metástases do paciente.
6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica consiste em fluido biológico, preferivelmente pré-tratado a fim de isolar as células de tumor circulantes contidas no dito fluido.
20
7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que as células de tumor circulantes são então cultivadas sob condições tais que elas secretem o NGF.
8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 e 7, caracterizado pelo fato de que as células de tumor circulantes são também cultivadas sob condições que bloqueiam o NGF dentro das ditas células.
25
9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a detecção do NGF é demonstrada por cultivo de células sensíveis ao NGF na presença da dita amostra biológica.
30
10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo

fato de que a dita amostra biológica consiste em uma amostra de fluido biológico, preferivelmente pré-tratado a fim de isolar as células de tumor circulantes contidas no dito fluido.

5 11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que as células de tumor circulantes são então cultivadas sob condições tais que elas secretem o NGF.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a detecção do NGF é demonstrada por detecção do mRNA do NGF na dita amostra biológica.

10 13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a dita amostra biológica consiste em uma amostra de fluido biológico ou de um tecido que se origina da biópsia do tumor ou das metástases do paciente.

15 14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica consiste em um tecido que se origina da biópsia do tumor ou das metástases do paciente.

20 15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica consiste em fluido biológico, preferivelmente pré-tratado a fim de isolar as células de tumor circulantes contidas no dito fluido.

16. Uso do método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que é em diagnose precoce, exame, acompanhamento terapêutico, prognóstico e na diagnose de recorrência no caso de câncer de mama.

FIG. 1A

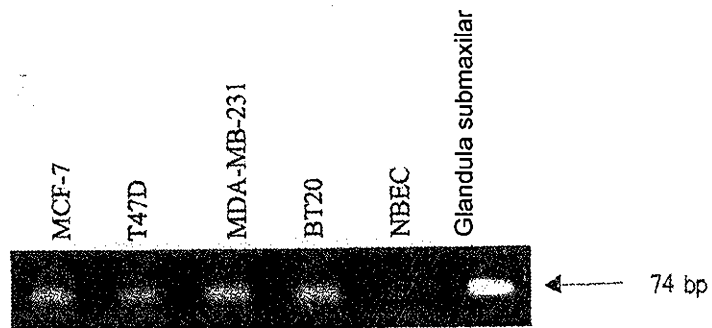


FIG. 1B

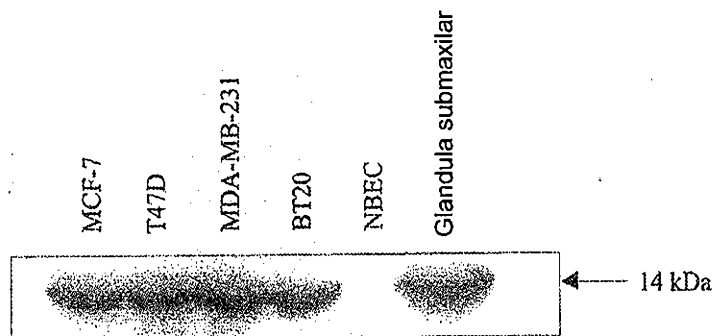


FIG. 1C

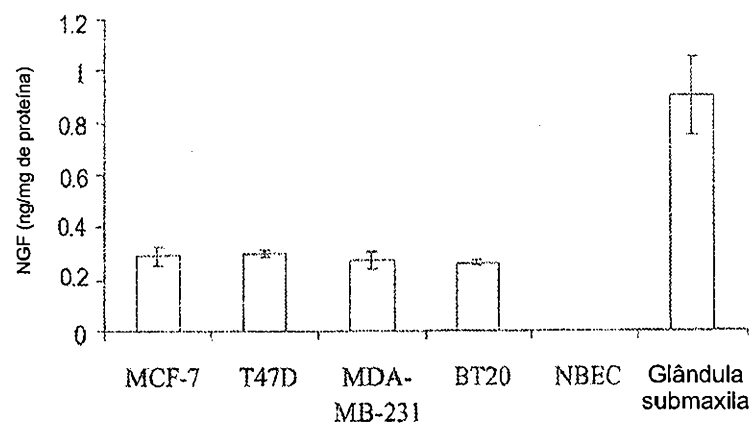


FIG. 1

FIG. 2A

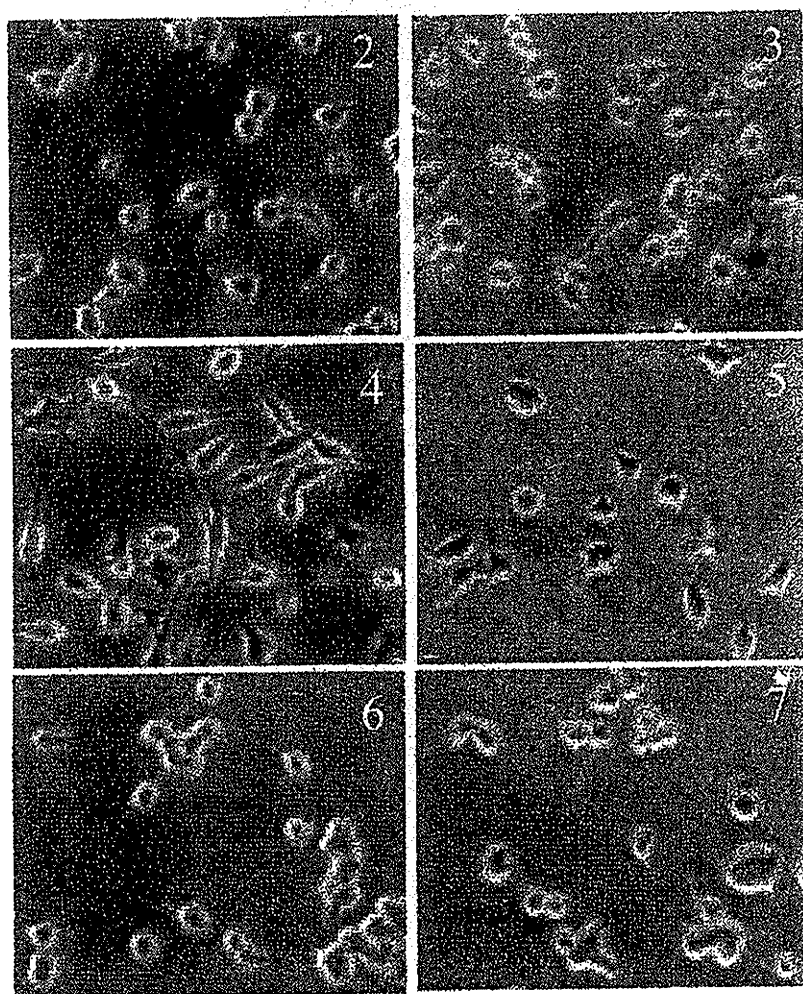
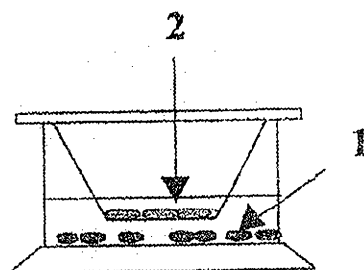


FIG. 2B

P10315735

4/2

3/6

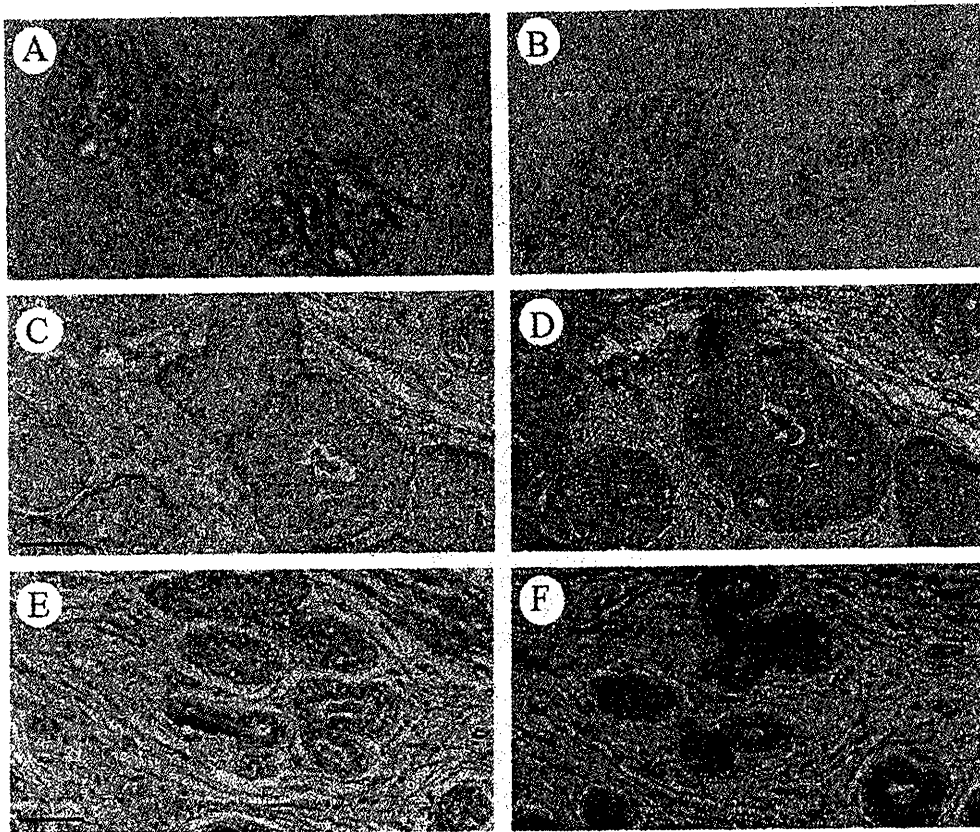


FIG. 3

FIG. 4A

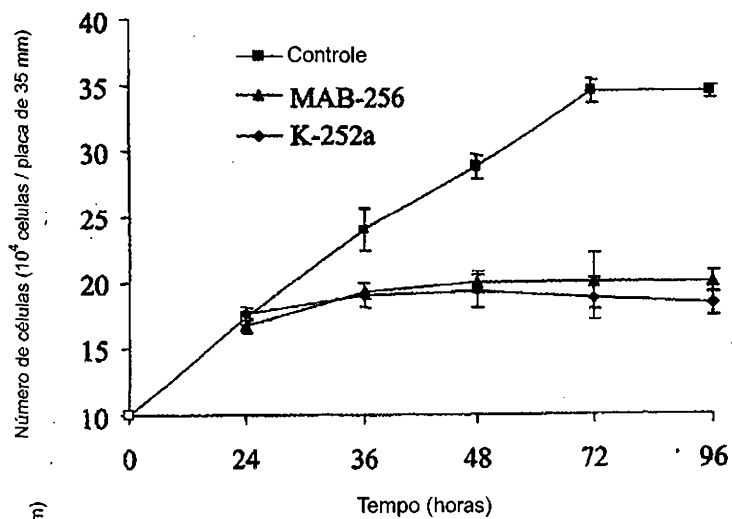


FIG. 4B

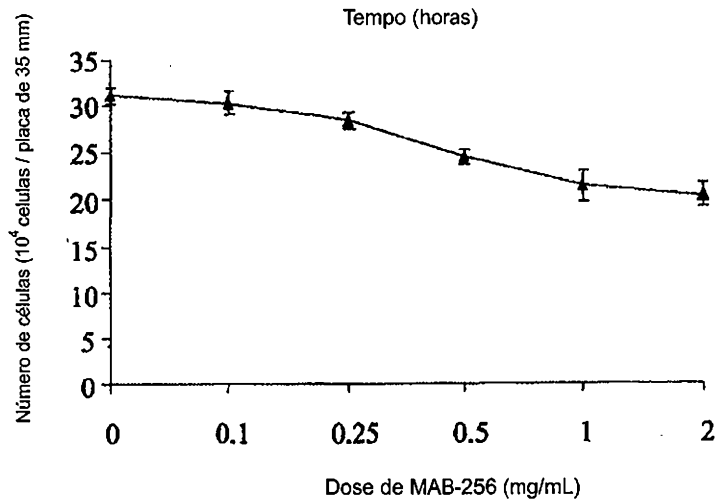


FIG. 4C

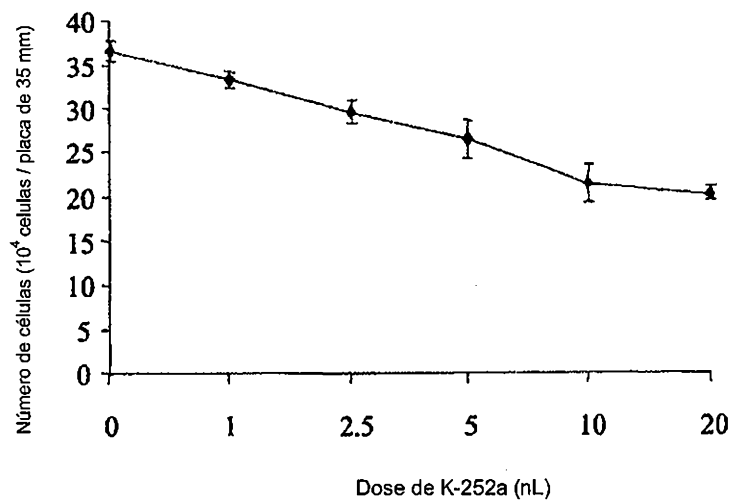


FIG. 4

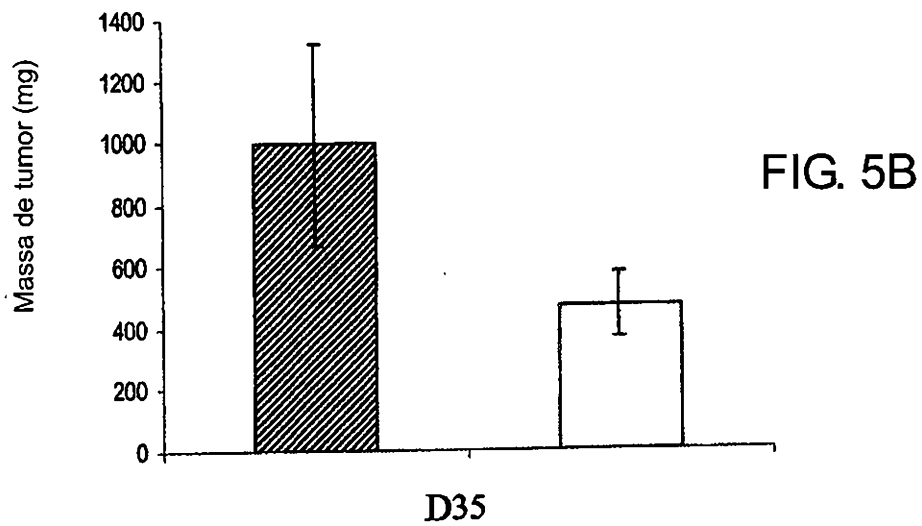
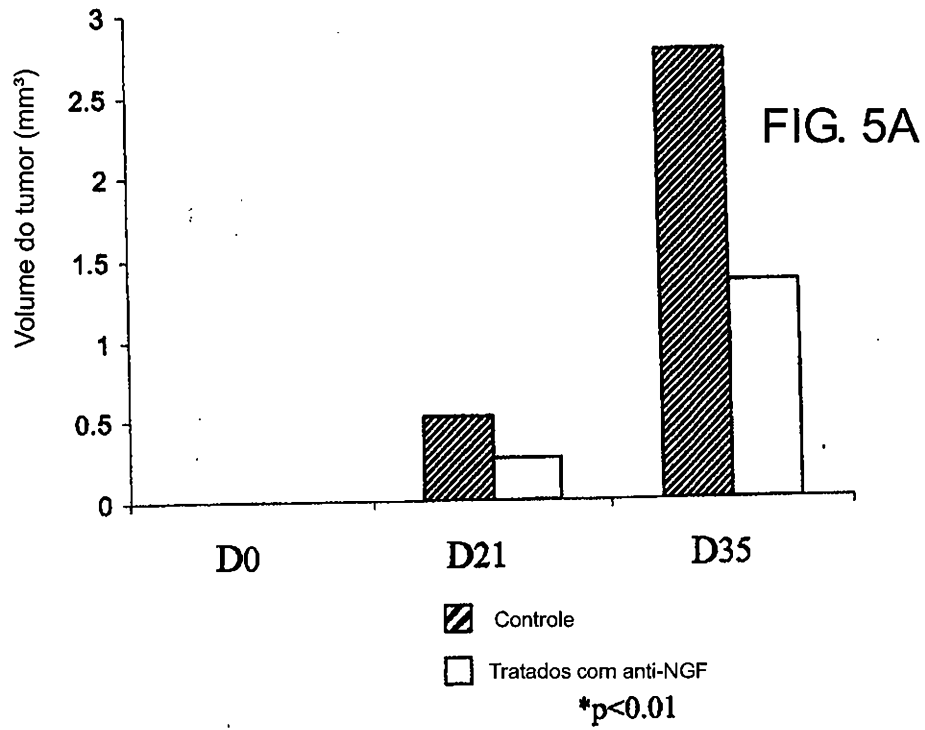


FIG. 5

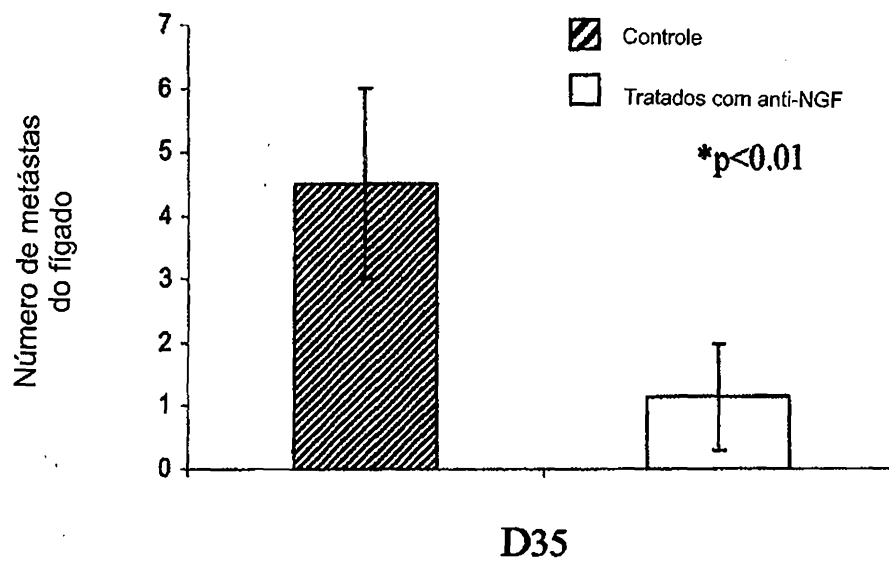


FIG. 5C

FIG. 5 (continuação)