



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 818**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03778473 .3**

96 Fecha de presentación : **28.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1556699**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Procedimiento de dosificación de NGF para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de mama y utilización terapéutica.**

30 Prioridad: **28.10.2002 FR 02 13428**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.08.2009

73 Titular/es: **BIOMERIEUX**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy-L'Etoile, FR
Université des Sciences et Technologies de Lille

72 Inventor/es: **Adriaenssens, Eric;**
Choquet-Kastylevsky, Geneviève;
Dolle, Laurent;
El-Yazidi, Belkoura, Ikram y
Hondermarck, Hubert

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 324 818 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

Procedimiento de dosificación de NGF para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de mama y utilización terapéutica.

5 La presente invención se refiere al campo de la cancerología. Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de diagnóstico del cáncer de mama en un paciente humano mediante determinación de la presencia de un factor de crecimiento nervioso (NGF) en una muestra biológica obtenida de este paciente, pudiendo utilizarse dicho procedimiento tanto en el diagnóstico precoz, el cribado, el seguimiento terapéutico y el pronóstico, como en el diagnóstico de recaídas en el marco del cáncer de mama. Además, debido a la capacidad de las células de
10 cáncer de mama para producir NGF, la presente invención también se refiere a la terapia.

En la mujer, el cáncer de mama es la primera causa de mortalidad por cáncer en los países industrializados. Se estima que el tamaño mínimo de un tumor detectable mediante mamografía es de 1 cm. Los cánceres de mama se desarrollan lentamente. Sin embargo, este tumor de pequeño tamaño presenta un pasado evolutivo de 8 años de
15 media en el momento del diagnóstico. La etiología del cáncer de mama no está bien definida. Se han demostrado predisposiciones familiares. La edad es el factor de riesgo más importante. De este modo, el riesgo aumenta un 0,5% por año de edad en los países occidentales. Se conocen otros factores de riesgo, tales como el número de embarazos y la edad del primer embarazo, la lactancia, la edad de la pubertad y de la menopausia, los tratamientos con estrógenos después de la aparición de la menopausia, el estrés y la alimentación.

20 El ensayo disponible y utilizado en el cribado de masas para el cáncer de mama es una técnica de formación de imágenes: la mamografía. Gracias a esta técnica, la mortalidad debida al cáncer de mama se ha reducido fuertemente (30% de reducción de la mortalidad), lo que subraya la importancia del cribado de los tumores en términos de salud pública. Sin embargo, las técnicas de cribado padecen cierto número de inconvenientes. La mamografía necesita un
25 material competitivo y personal cualificado lo que es costoso en el marco de un cribado de masas.

El la práctica clínica, la caracterización de un tumor en términos de malignidad se realiza después de su descubrimiento mediante métodos histológicos en laboratorios especializados. Un conjunto de parámetros tales como el tamaño del tumor, su grado histopatológico, la inflamación asociada y la invasión ganglionar, se utilizan para decidir
30 la actuación terapéutica y para estimar el pronóstico de la enfermedad.

Desde hace años se buscan y estudian marcadores que permitan distinguir las células tumorales de las células sanas para el cáncer de mama. Estos permitirían diagnosticar precozmente la enfermedad, establecer su pronóstico y su sensibilidad al tratamiento y supervisar su evolución. Hasta ahora los marcadores candidatos que se han identificado
35 y estudiado han sido oncogenes, marcadores tisulares y marcadores asociados a la angiogénesis o a las capacidades metastáticas del tumor. Actualmente, los marcadores de cáncer de mama identificados sirven principalmente para el seguimiento terapéutico. No existe ningún ensayo biológico validado para el diagnóstico precoz ni para el cribado del cáncer de mama. Solamente la detección de los receptores de estrógenos en el tejido normal permite determinar si los tumores serán o no sensibles a hormonas.

40 Un número limitado de marcadores antigénicos, en particular el CA 15-3 (Basuyau, J. P., M. P. Blanc-Vincent, J. M. Bidant, A. Daver, L. Deneux, N. Eche, G. Gory-Delabaere, M. F. Pichon y J. M. Riedinger, 2000 [Standards, Options and recommendations (SOR) for tumor markers in breast cancer. SOR Working Group]. Bull Cancer. 87: 723-37) se ha identificado en el caso de las células mamarias cancerosas. Este marcador se utiliza en la práctica habitual
45 para el seguimiento de los pacientes, en particular para la detección de recidiva, pero debido a su reducida sensibilidad, no se ha propuesto su uso en ensayos de cribado ni de diagnóstico.

Desde hace varios años, se han desarrollado trabajos relacionados con los antígenos asociados al cáncer de mama, no para investigar marcadores, sino para investigar dianas para una inmunoterapia. Estos se refieren a la demostración
50 de una inmunidad humoral contra los antígenos T/Tn (Springer, G. F. 1997. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. J Mol Med. 75: 594-602), hasta el descubrimiento más reciente de anticuerpos y de respuestas de células T dirigidas contra p 53 (Gnjatic, S., Z. Cai, M. Viguier, S. Chouaib, J. G. Guillet, y J. Chopin. 1998. Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53
55 epitope presented by breast carcinomas and melanomas. J. immunol. 160: 328-33) y HER-2/neu (Disis, M L., y M. A. Cheever. 1997. HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. Adv Cancer Res. 71: 343-71).

Más recientemente, se ha demostrado una serie de nuevos antígenos potenciales mediante el enfoque SEREX (“serological expression cloning”), que se basa en la construcción de bibliotecas de ADNc de células tumorales y un cribado con suero autólogo. De este modo, un cribado serológico de biblioteca de cáncer de mama permitió la
60 demostración del antígeno *ING1* (Jager, D., E. Stockert, M. J. Scanlan, A. O. Gure, E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, y Y. T. Chen. 1999, Cancer-testis antigens and *ING1* tumor supresor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific *ING1* transcripts and a homologue gene. Cancer Res. 59: 6197-204), y después de un nuevo antígeno de diferenciación *NY-BR-1*, expresado de acuerdo con los autores en el 80% de los cánceres de mama y que induce
65 la producción de anticuerpos IgG en los pacientes (Jager, D., E. Stockert, A. O. Gure, M. J. Scanlan, J. Karbach, E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, y 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). Este tipo de enfoque, que servía principalmente para la búsqueda de dianas potencialmente utilizables para el desarrollo de vacunas, no excluye

a priori los antígenos presentes en el tejido normal (este es el caso de *NY-BR-1*), ni los reconocidos por un número limitado de sueros de pacientes (2/14 para *ING1*), por lo tanto no son aprovechables para una estrategia de cribado o de diagnóstico precoz. Mediante el mismo enfoque, otros antígenos que inducen una respuesta inmune humoral en los pacientes se señalaron como NY-BR-62, NY-BR-85 y la proteína D52. Estos antígenos estarían sobre-expresados respectivamente en el 60%, 90% y 60% de los cánceres de mama (Scanlan, M. J., y D. Jager. 2001. Challenges to the development of antigen-specific breast cancer vaccines. *Breast Cancer Res.* 3: 95-8).

Los fenómenos moleculares que conducen al desarrollo de un cáncer de mama implican modificaciones de la estructura y de la expresión de oncogenes (tales como *ras*) y de genes supresores de tumores como *p53*. El crecimiento de las células tumorales en la mayor parte de los cánceres de mama depende de las hormonas estrogénicas (estradiol y progesterona) y de factores de crecimiento que controlan la proliferación, la migración y la apoptosis. Estos factores de crecimiento estimulan o inhiben la proliferación, migración y diferenciación de las células tumorales para que actúen de forma concertada para favorecer el crecimiento del cáncer y las metástasis. Por ejemplo, los factores de crecimiento de tipo insulina, el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) todos pueden estimular la proliferación de las células del cáncer de mama, mientras que el inhibidor del factor de crecimiento derivado de la mama (MDGI) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) inhiben su crecimiento.

Descamps, S. *et al.*, demostraron que el factor de crecimiento NGF, el primer factor neurotrófico descubierto, añadido *in vitro* a líneas celulares en cultivo (NGF exógeno), es potencialmente capaz de activar a la vez la supervivencia y la proliferación de las células de cáncer de mama (1998, *J. Biol. Chem.*, 273(27), 16659-16662 y 2001, *J. Biol. Chem.*, 276(21), 17864-17870).

El NGF se aisló originalmente por su capacidad para estimular tanto la supervivencia como la diferenciación de las neuronas periféricas, que se convierten más tarde en el elemento arquetipo de la familia neurotrófica de los polipéptidos (Levi-Montalcini, R., 1987, *Science*, 237, 1154-1162). Una función biológica principal del NGF es el mantenimiento y la supervivencia de las neuronas post-mitóticas, lo que le convierte en un candidato importante para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Además de su papel en el desarrollo y el mantenimiento de las células neuronales, el NGF también tiene efectos significativos sobre las células no neuronales. De este modo, por ejemplo, es un factor de supervivencia autocrino de los linfocitos B (Torcia, M., *et al.*, 1996, *Cell*, 85, 345-356).

El NGF genera señales intracelulares mediante interacción con dos clases de receptor de membrana: el producto proto-oncogénico de *TrkA* $p140^{trkA}$, que posee una actividad tirosina quinasa intrínseca y un segundo receptor, $p75^{NTR}$, que pertenece a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). En las células de cáncer de mama, existen dos vías de señalización distintas activadas por el NGF. El efecto mitogénico necesita el receptor $p140^{trkA}$ y la cascada MAP quinasa, mientras que el efecto anti-apoptosis depende del receptor $p75^{NTR}$ y de la activación aguas abajo del factor NF- κ B (Descamps, S. *et al.*, 2001, *supra*). De este modo, para el diagnóstico del cáncer de mama, algunos autores se han centrado en la detección de los receptores de NGF, como por ejemplo en la solicitud de patente WO94/06935 que describe un procedimiento de diagnóstico de un estado precanceroso o canceroso en un paciente mediante dosificación de la cantidad del receptor $p75$.

El potente efecto biológico de NGF sobre las células de cáncer de mama plantea también la cuestión de su distribución en la glándula mamaria y de su origen. Se piensa generalmente que el NGF es producido por dianas de inervación simpática y sensorial, aunque no se ha encontrado en la circulación sanguínea (Bonini, S. *et al.*; 1996, *Proc., Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10955-10960).

La solicitante ha demostrado ahora de forma sorprendente que las propias células de cáncer de mama producen NGF, mientras que las células epiteliales mamarias normales correspondientes no lo producen, de modo que el NGF puede utilizarse como marcador tumoral o bien como diana terapéutica.

De este modo, la presente invención tiene como primer objeto un procedimiento de diagnóstico de cáncer de mama mediante determinación de la presencia de NGF en muestras obtenidas de pacientes sospechosos de padecer cáncer de mama.

El procedimiento de la invención permite, por lo tanto, diagnosticar el cáncer de mama mediante un ensayo simple que consiste en buscar la presencia de NGF en una muestra biológica extraída de un paciente. La solicitante ha mostrado de forma inesperada que las células cancerosas producen NGF, mientras que las células correspondientes no cancerosas eran incapaces de producirlo, como se demostrará de forma más detallada a continuación. De este modo, la determinación de la presencia de NGF en la muestra permite llegar a la conclusión de la presencia de la patología buscada, permitiendo la ausencia de NGF llegar a la conclusión de la ausencia de patología.

Se entiende por determinación de la presencia de NGF, la detección directa de NGF o el cultivo de células sensibles a NGF, o la detección del ARNm de NGF en la muestra biológica o cualquier otro procedimiento de determinación de la presencia de una proteína en una muestra, conocido por el experto en la materia.

La determinación de la presencia de NGF mediante detección directa del NGF constituye una realización particular de la invención.

ES 2 324 818 T3

Por detección directa del NGF, se entiende la demostración de la presencia del propio NGF en la muestra biológica.

La detección directa de NGF en la muestra biológica puede realizarse mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, como por ejemplo mediante ensayo inmunológico o mediante espectrometría de masas, lo que constituye una realización particular de la invención.

El ensayo inmunológico puede ser cualquier ensayo muy conocido por el experto en la materia que implica reacciones inmunológicas, a saber reacciones entre el NGF y un socio de unión específico del NGF.

Los socios de unión específicos de NGF son cualquier socio susceptible de unirse a NGF. Como ejemplo, pueden mencionarse los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos, los receptores y cualquier otra proteína capaz de unirse al NGF.

Los anticuerpos socios de unión son anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse mediante inmunización de un animal con NGF, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, mediante extracción del suero de dicho animal y separación de dichos anticuerpos de los demás constituyentes del suero, particularmente mediante cromatografía de afinidad en una columna en la que se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, particularmente el NGF.

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante la técnica de hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.

En un primer momento, se inmuniza un animal, generalmente un ratón (o células en cultivo en el marco de inmunizaciones *in vitro*) con NGF, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos se fusionan a continuación con células mielomatosas “inmortales” (múridas en el ejemplo) para dar lugar a hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células obtenida de este modo, se realiza entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y de multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento con respecto al antígeno tumoral de interés podrían ensayarse por ejemplo en ELISA, mediante inmunotransferencia en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia o con ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales seleccionados de este modo, se purifican a continuación particularmente de acuerdo con la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

Ejemplos de anticuerpos anti-NGF se conocen y están disponibles particularmente en el catálogo de R&D Systems o de Santa Cruz.

Los socios de unión específicos de NGF podrán marcarse para el revelado de la unión de NGF/socio de unión cuando el socio de unión se utiliza como reactivo de detección, y por lo tanto para la detección directa de NGF en la muestra biológica.

Por marcado de los socios de unión, se entiende la fijación de un marcador capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitante de estos marcadores consiste en:

- enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, α -galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,
- cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,
- moléculas radiactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , y
- moléculas fluorescentes tales como alexa o ficocianinas.

También pueden utilizarse sistemas indirectos, como por ejemplo ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Las parejas ligando/anti-ligando las conocen bien el experto en la materia, como es el caso por ejemplo de las siguientes parejas: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectinas, polinucleótido/complementario del polinucleótido. En este caso, es el ligando el que tiene el agente de unión. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los marcadores descritos en el párrafo anterior o ser él mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

Estos sistemas indirectos de detección pueden conducir, en algunas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia y podremos remitirnos a las patentes anteriores FR98/10084 o WO-A-95/08000 de la solicitante o al artículo J. Histochem. Cytochem. 45: 481-491, 1997.

Según el tipo de marcado del conjugado utilizado, el experto en la materia añadirá reactivos que permiten la visualización del marcado.

ES 2 324 818 T3

Como ejemplo de ensayos inmunológicos tales como se han definido anteriormente, pueden mencionarse los métodos “sándwich” tales como ELISA, IRMA y RIA, los métodos llamados de competencia y los métodos de inmunodetección directa como inmunohistoquímica, inmunocitoquímica transferencia de Western e inmunotransferencia “Dot-blot.”

5

También puede utilizarse espectrometría de masas para la detección directa de NGF en la muestra biológica. El principio de la espectrometría es muy conocido por el experto en la materia y se describe por ejemplo en Patterson, S., 2000, Mass spectrometry and proteomics. *Physiological Genomics* 2, 59-65.

10

Para ello, la muestra biológica, tratada previamente o no, se pasa por un espectrómetro de masas y se compara el espectro obtenido con el de NGF. Un ejemplo de tratamiento previo de la muestra consiste en hacerle pasar sobre un soporte de inmunocaptura, que comprende uno de los socios de unión a NGF, por ejemplo un anticuerpo dirigido contra NGF.

15

La muestra biológica utilizada para la detección directa del NGF, susceptible de contener NGF como tal, puede estar constituida por fluido biológico o un tejido procedente de la biopsia del tumor o de metástasis del paciente en cuestión.

20

Como fluido biológico, pueden mencionarse sangre, médula ósea, leche, líquido cefalorraquídeo, orina y exudados.

25

Para la detección de NGF, el fluido biológico, que constituye una realización particular de la invención, puede necesitar un tratamiento particular. En efecto, el fluido biológico puede contener NGF como tal o puede contener células tumorales circulantes que contienen NGF y eventualmente células tumorales circulantes que son capaces de secretar NGF.

30

De este modo, de acuerdo con una realización de la invención, el fluido biológico se trata previamente para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.

Por aislar las células tumorales circulantes, se entiende obtener una fracción celular enriquecida en células tumorales circulantes.

35

El tratamiento del fluido para aislar las células tumorales circulantes puede realizarse mediante clasificación celular en un citómetro de flujo, mediante enriquecimiento en Ficoll, mediante enriquecimiento con perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos o mediante cualquier otro método de enriquecimiento específico conocido por el experto en la materia.

40

En el caso de la sangre o de la médula ósea como fluido biológico, las células tumorales circulantes pueden aislarse gracias a una técnica de separación celular en Ficoll asociada a un agotamiento de las células sanguíneas utilizando anticuerpos anti-CD45 acoplados a perlas magnéticas (Dynal Biotech ASA, Noruega).

45

La detección directa de NGF puede realizarse entonces directamente a partir de células tumorales circulantes aisladas del fluido biológico, por ejemplo mediante marcado inmunocitoquímico de estas células con anticuerpo anti-NGF, después de depositar las células tumorales circulantes sobre un portaobjetos con citospina. La detección directa del NGF también puede realizarse directamente en las células tumorales circulantes utilizando el método de citometría de flujo tal como se describe en Métzéau P, Ronot X, Le Noan-Merdrignac G, Ratinaud MH, “La cytométrie en flux pour l’étude de la cellule normale o pathologique” (Tomo I), Eds Medsi-MacGrawhill.

50

En estas condiciones, dichas células circulantes pueden tratarse en condiciones que permitan el bloqueo del NGF en el interior de dichas células. Dicho tratamiento se describe por ejemplo en “Intracellular Flow Cytometry, Applied reagents and Techniques”, págs 1-21, BD Pharmingen.

55

La detección del NGF se realiza entonces después de haber permeabilizado la membrana de las células para hacer que entren los socios de unión específica a NGF.

La detección directa de NGF a partir de las células circulantes también puede realizarse con ayuda del procedimiento descrito en la solicitud de patente WO03/076942 depositada por una de las Solicitantes.

60

La detección directa de NGF en las células tumorales puede realizarse también en el medio de cultivo de dichas células después de cultivarlas en condiciones tales que secreten NGF.

Estas condiciones de cultivo son condiciones convencionales tales como 37°C en atmósfera húmeda y al 5% de CO₂.

65

Cuando la muestra biológica a ensayar es tejido procedente de la biopsia del tumor o de metástasis del paciente, lo que constituye una realización particular de la invención, la detección directa de NGF se realiza directamente en los cortes obtenidos, sin tratamiento previo de dicho tejido.

ES 2 324 818 T3

Otro modo de detección de la presencia de NGF consiste en el cultivo, en presencia de la muestra biológica, de células sensibles a NGF, lo que constituye una realización particular de la invención.

5 En este caso, la detección de la presencia de NGF en una muestra biológica se demuestra mediante la reacción de las células sensibles a NGF.

Por células sensibles a NGF, se entiende cualquier célula estimulada en presencia de NGF (crecimiento, apoptosis, etc.).

10 Como células sensibles a NGF, pueden mencionarse las células de feocromocitoma PC12 (Honder marck H *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 9377-81) y las células embrionarias de origen neuronal (Hattori A, *et al.*, 1993, J. Biol. Chem., 268: 2577-2582).

15 La muestra biológica que puede utilizarse para la detección de la presencia de NGF mediante cultivo de células sensibles a NGF puede ser cualquier muestra tal como se ha descrito anteriormente.

20 De este modo, la muestra biológica puede estar constituida por fluido biológico, llegado el caso, tratado previamente para aislar las células tumorales circulantes, que, a su vez, pueden cultivarse en condiciones tales que secreten NGF, como se ha descrito anteriormente.

Otro modo de detección de la presencia de NGF en las muestras biológicas consiste en la detección del ARNm de NGF en dicha muestra, lo que constituye una realización de la invención.

25 La detección del ARNm en una muestra líquida es conocida ampliamente por el experto en la materia.

Ésta puede realizarse por ejemplo mediante reacciones de hibridación entre el ARNm diana y un ácido nucleico capaz de unirse con el ARNm diana.

30 Se entiende por ácido nucleico los oligonucleótidos, ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos, así como sus derivados.

35 El término "oligonucleótido" designa una sucesión de al menos 2 nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o ambos), naturales o modificados, que pueden hibridar, en condiciones apropiadas de hibridación, con un oligonucleótido al menos parcialmente complementario. Por nucleótido modificado, se entiende por ejemplo un nucleótido que comprende una base modificada y/o que comprende una modificación a nivel del enlace internucleotídico y/o a nivel del esqueleto. Como ejemplo de base modificada, puede mencionarse inosina, metil-5-desoxicidina, dimetilamino-5-desoxiuridina. Para ilustrar un enlace internucleotídico modificado, pueden mencionarse los enlaces fosforotioato, N-alquilfosforamidato, alquilfosfonato y alquilfosfodiéster. Los alfa-oligonucleótidos tales como los descritos en FR-A-2 607 507, los LNA tales como fosforotioato-LNA y 2'-tio-LNA descritos en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volumen 8, Número 16, 18 de agosto de 1998, páginas 2219-2222, y los PNA que son el objeto del artículo de M. Egholm *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897, son ejemplos de oligonucleótidos constituidos por nucleótidos cuyo esqueleto está modificado.

45 El revelado de las reacciones de hibridación puede realizarse mediante marcado de los ácidos nucleicos de unión, como se ha ilustrado anteriormente.

50 Antes de la hibridación con el ácido nucleico de unión, el ARNm diana puede extraerse mediante métodos conocidos por el experto en la materia y después amplificarse opcionalmente, como por ejemplo por RT-PCR o por NASBA (Maleck, L., *et al.*, 1994, Methods in Molecular Biology 28, cap. 36, Ed P.G. Isaac, Humana Press, Inc., Totowa, NJ).

La muestra biológica que puede utilizarse para la detección de la presencia de NGF mediante detección de ARNm de NGF puede ser cualquier muestra tal como se ha descrito anteriormente.

55 De este modo, la muestra biológica puede estar constituida por tejido obtenido de biopsia de tumor o de metástasis, o bien de fluido biológico, llegado el caso tratado previamente para aislar las células tumorales circulantes, como se ha descrito anteriormente.

60 El procedimiento de la invención puede utilizarse tanto para el diagnóstico precoz, como para el cribado, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de recaídas en el marco del cáncer de mama, ya que solamente las células cancerosas producen NGF y que esta producción está en función del grado del cáncer.

65 De este modo, otro objeto de la invención consiste en la utilización del procedimiento de la invención en el diagnóstico precoz, el cribado, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de recaídas en el marco del cáncer de mama.

Además de un papel de marcador tumoral, el NGF también puede tener un papel de diana terapéutica. En efecto, debido a la capacidad de las células de cáncer de mama para producir NGF, mientras que las células normales no

lo producen, la proliferación tumoral y la diseminación a distancia de las células de cáncer de mama pueden ser bloqueadas por un socio de unión a NGF susceptible de bloquear la proliferación celular o por un inhibidor de NGF.

Los socios de unión a NGF y los inhibidores de NGF pueden utilizarse por lo tanto como medicamentos.

De este modo, la presente invención también tiene por objeto la utilización de un socio de unión a NGF o de un inhibidor de NGF para la preparación de un medicamento, entendiéndose que, en el marco del cáncer, los socios de unión a NGF no son receptores para NGF o fragmentos activos de estos receptores.

De acuerdo con una realización particular de la invención, dicho medicamento es útil para bloquear la proliferación tumoral y la diseminación a distancia en los pacientes que padecen cáncer de mama.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo al menos un socio de unión a NGF o un inhibidor de NGF, opcionalmente en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, también se incluyen en la invención, entendiéndose que, en el marco del cáncer, los socios de unión a NGF no son receptores para NGF o fragmentos activos de estos receptores.

Las composiciones farmacéuticas útiles contra el cáncer de mama comprenden, como principio activo, al menos un socio de unión a NGF susceptible de bloquear la proliferación tumoral celular o un inhibidor de NGF.

Los socios de unión a NGF específicos apropiados como principio activo son particularmente tal como se han definido anteriormente en los ensayos inmunológicos y pueden ser cualquier otro socio conocido por el experto en la materia capaz de bloquear la proliferación tumoral. De acuerdo con una realización particular, el socio específico susceptible de bloquear la proliferación de células de cáncer de mama es un anticuerpo anti-NGF.

Por inhibidor de NGF, se entiende inhibidores directos de NGF, es decir inhibidores que bloquean la actividad biológica de la proteína, inhibidores de las vías de excitosis de NGF, inhibidores de ARNm de NGF e inhibidores del gen que codifica NGF.

Como inhibidor directo de NGF, puede mencionarse el inhibidor K-252a (Tapley, P. *et al.*, 1992, *Oncogene* 7, 371-281).

Los inhibidores de las vías de excitosis de las proteínas y en particular del NGF son ampliamente conocidos por el experto en la materia.

Como inhibidor del ARNm de NGF, puede utilizarse un fragmento sintético de este ARNm. En efecto, la tecnología del ARN interferente se basa en la utilización de un oligonucleótido de ARN de cadena doble correspondiente a una corta secuencia del ARNm celular a inhibir. Este oligonucleótido de cadena doble (introducido o no en un plásmido), después de la entrada en la célula, queda a cargo del sistema enzimático Dicer/Risc, lo que conlleva la degradación del ARNm celular correspondiente (Dykxhoorn D *et al.*, 2003, *Nature Reviews*, vol. 4. p 457-467).

Como inhibidor del gen que codifica NGF, puede mencionarse un oligonucleótido anti-sentido de NGF. Este oligonucleótido puede prepararlo fácilmente el experto en la materia.

Para dirigir la acción terapéutica de los socios de unión a NGF o de los diferentes inhibidores, estos últimos pueden ponerse en condiciones tales que penetren específicamente en las células de interés, tales como las células tumorales, lo que constituye otra realización de la invención.

Para ello, pueden estar fijados por ejemplo a un socio que permita dicha penetración, como por ejemplo una molécula portadora, un polímero tal como los polímeros utilizados en terapia génica o bien un vector viral tal como los adenovirus y poxvirus, también utilizados en terapia génica.

Por ejemplo, en el marco del cáncer de mama, la molécula portadora puede ser un anticuerpo anti-MUCI o un anticuerpo anti-célula epitelial o bien también un anticuerpo anti-HER-2/neu.

Preferentemente, cuando la composición farmacéutica comprende como principio activo un socio de unión a NGF o un inhibidor de NGF tal como un inhibidor directo o un inhibidor de las vías de excitosis de NGF, estos últimos se ponen en condiciones tales que penetren específicamente en las células tumorales de interés, los inhibidores del ARNm de NGF y los inhibidores del gen que codifica el NGF que tiene la capacidad de penetrar de forma natural en dichas células.

La cantidad y la naturaleza del excipiente puede determinarlas fácilmente el experto en la materia. Éstas se seleccionan de acuerdo con la forma farmacéutica y el modo de administración deseados.

En las composiciones farmacéuticas de la invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intravenosa, tópica, rectal, local, intracraneal, intranasal, transdérmica, rectal, intraocular, intraauricular, pudiendo administrarse dicho principio activo en forma de administración unitaria.

ES 2 324 818 T3

Las formas de administración unitaria pueden ser por ejemplo, comprimidos, grageas, gránulos, polvos, soluciones o suspensiones orales inyectables, parches transdérmicos (“patch”), formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraocular, intranasal, intra-auricular, por inhalación, formas de administración tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intratumoral o intravenosa, formas de administración rectal o implantables. Para la administración tópica, pueden preverse cremas, geles, pomadas, lociones o colirios.

Estas formas galénicas se preparan de acuerdo con los métodos usuales de los campos considerados.

Dichas formas unitarias se dosifican para permitir una administración diaria de 0,001 a 10 mg de principio activo por kg de peso corporal, de acuerdo con la forma galénica.

Puede haber casos particulares donde las dosificaciones más altas o más reducidas son apropiadas; dichas dosificaciones no salen del marco de la invención. De acuerdo con la práctica habitual, la dosificación apropiada para cada paciente es determinada por el médico de acuerdo con el modo de administración, el peso y la respuesta del paciente.

De acuerdo con otra realización, la presente invención también se refiere a un método de tratamiento del cáncer de mama que comprende la administración, a un paciente, de una dosis eficaz de un socio de unión a NGF o de un inhibidor de NGF.

La invención se entenderá mejor con ayuda de los siguientes ejemplos que se dan a título ilustrativo y no limitante, así como con ayuda de las figuras 1 a 5 adjuntas, en las que:

- la figura 1 se refiere a representaciones gráficas relativas a la demostración de la expresión de NGF en células cancerosas, en la que:

- o la figura 1A representa un gel de electroforesis que demuestra, después de RT-PCR, la secreción de NGF por las células cancerosas MCF-7, T47D, MDA-MB-231 y BT20 y por las células de la glándula submaxilar como control, así como la ausencia de dicha secreción por las células normales NBEC (*Normal Breast Epithelial Cells*),
- o la figura 1B representa un gel de electroforesis que demuestra, después de inmunotransferencia, la secreción de NGF por las células cancerosas MCF-7, T47D, MDA-MB-231 y BT20 y por las células de la glándula submaxilar, así como la ausencia de dicha secreción por las células NBEC, y
- o la figura 1C es un gráfico que da la cantidad de NGF secretado en función de las células ensayadas mediante ELISA, a saber las células cancerosas MCF-7, T47D, MDA-MB-231 y BT20, las células de la glándula submaxilar y las células NBEC,

- la figura 2 se refiere a las representaciones sobre el co-cultivo de células cancerosas y de células sensibles a NGF, en la que:

- o la figura 2A representa el esquema experimental de co-cultivo de las células PC12(1) que se desarrollan en presencia de NGF y de células cancerosas (2), y
- o la figura 2B está constituida por fotografías que representan el cultivo de células PC12 como control (foto 2), la diferenciación de las células PC12 bajo la influencia de NGF (foto 3), el co-cultivo de células sensibles a NGF en presencia de células cancerosas MCF-7 (foto 4), el cultivo de células cancerosas MCF-7 en presencia de un anticuerpo anti-NGF (foto 5), el cultivo de células cancerosas MCF-7 en presencia del inhibidor K252a (foto 6), el cultivo de células mamarias normales NBEC (foto 7)

- la figura 3 representa fotografías de inmunocitoquímica que demuestran la expresión de NGF mediante inmunodetección en tejido obtenido de biopsia, en la que las fotos A y B se refieren al tejido normal, respectivamente con o sin marcado con NGF, refiriéndose las fotos C a F al tejido canceroso, refiriéndose las fotos C y E a los cortes sin marcado con NGF (control negativo) y refiriéndose las fotos D y F a los cortes con marcado con NGF,

- la figura 4 se refiere a gráficos que demuestran la influencia de un socio de unión susceptible de bloquear la proliferación de las células de cáncer de mama sobre el crecimiento celular, en la que:

- o la figura 4A representa un gráfico que muestra el crecimiento de las células MCF-7 en número de células (10^4 células/disco de 35 mm), sin agente de bloqueo de la proliferación tumoral como control o en presencia del anticuerpo anti-NGF MAB-256 o en presencia del inhibidor K-252a, y
- o las figuras 4B y 4C representan gráficos que dan el número de células MCF-7 en función de la dosis de anticuerpo MAB-256 (figura 4B) o de la dosis de inhibidor K-252a (figura 4C) y

- la figura 5 da gráficos que demuestran la influencia de un anticuerpo anti-NGF, en función del tiempo, sobre el volumen tumoral (figura 5A), sobre la masa tumoral (figura 5B) y sobre el número de metástasis hepáticas (figura 5C) de células de cáncer de mama de ratón.

ES 2 324 818 T3

Ejemplo 1

Demostración de la expresión de NGF en células de cáncer de mama mediante RT-PCR

5 1.1 Células ensayadas

Se ensayaron 4 líneas de células de cáncer de mama humano, a saber las células MCF-7, T47D, MDA-MB-231 y BT20, obtenidas de de la colección ATCC (Rockville, MD) con los números HTB-22, HTB-133, HTB-26 y HTB-29, respectivamente.

10 Estas células se mantuvieron en medio mínimo esencial (sal de Earle, BioWhittaker, Bélgica) suplementado con HEPES 20 mM, 2 g/l de bicarbonato sódico, 2 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal de ternero (FCS), 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 1% de aminoácidos esenciales y 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina.

15 Como comparación, se ensayaron células epiteliales de mama normales (NBEC) obtenidas de del Departamento de Cirugía Plástica de la Universidad Médica de Lille (Prof. Pellerin, Francia) que se cultivaron en medio DMEM/F12 (1/1) (BioWhittaker) que contenía el 5% de FCS, 10 UI/ml de insulina, 5 μM de cortisol, 2 ng/ml de EGF, 100 ng/ml de toxina del cólera, 100 ng/ml de penicilina y 45 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (medio B1). Cuando las células se aproximaban a la confluencia, se les colocaba en el mismo medio, excepto que se había reducido la concentración de calcio a 20 μM .

También se utilizaron las células de glándula submaxilar humana, obtenidas a partir de restos de disecciones hospitalarias, como fuente conocida de NGF.

25 1.2 RT-PCR

Se aisló el ARN total de células cancerosas, de células NBEC y de la glándula submaxilar humana (20 mg de peso) utilizando el kit Rneasy mini (Qiagen, Francia). Se realizó la ruptura y la homogeneización de la glándula submaxilar utilizando un homogeneizador Rotor-Stator (Briolyser, Hybaid).

30 Se cuantificó la cantidad de ARN extraída midiendo la absorbancia a 260 nm y se investigó la pureza del ARN mediante la proporción de absorbancia a 260 nm y a 280 nm. Se confirmó la ausencia de degradación de ARN mediante electroforesis del ARN en un gel de agarosa al 1,5% que contenía bromuro de etidio.

35 Se realizó la transcripción inversa (RT) añadiendo una mezcla de reacción que contenía 2 g de ARNm total purificado, 1X tampón de reacción, 10 mM de DTT, 40 mM de dNTP cada uno, 2,5 M de oligo(dT), 40 unidades de Rnasine y 200 unidades de transcriptasa inversa de virus de la leucemia murina Moloney a 25 μl de volumen de reacción total. Todas las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 h y después se inactivan a 95°C durante 5 minutos.

40 La PCR se realizó en los ADNc después de la RT o sobre las muestras de ARN sin etapa de RT para los controles negativos de la siguiente manera:

A los tubos de PCR, se añaden 5 μl de tampón de PCR (200 mM de Tris-HCl, pH 8,4, KCl 500 mM), 10 μl de MgCl_2 15 mM, 1 ml de dNTP mix 10 mM, 1 μl de ADNc o de ARNm total (para el control negativo), 1 μl de las sondas 50 mM para el gen *ngf* indicadas a continuación, 1 μl de 2,5 unidades/ μl de ADN polimerasa Taq y agua hasta un volumen total de 50 μl .

Sonda sentido: 5'-GACAGTGTCAGCGTGTGGGTT-3'

50 Sonda antisentido: 5'-CCCAACACCATCACCTCCTT-3'

Las condiciones de PCR eran las siguientes: después del tratamiento a 95°C durante 3 minutos para desnaturalizar el ADNc, se realizaron 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 57°C durante 2 minutos y 72°C durante 3 minutos. A continuación se incubaron los tubos de PCR durante 10 minutos suplementarios a 72°C para la extensión de los fragmentos de ADNc después del ciclo final.

La visualización del material amplificado bajo luz ultravioleta mediante tinción con bromuro de etidio después de electroforesis en gel de agarosa se representa en la figura 1A. Esta figura muestra un producto de transcripción de *ngf* de 74 pb para las células epiteliales cancerosas y las células de la glándula submaxilar (control positivo), mientras que este producto no se detecta para las células NBEC.

Este ensayo permite, por lo tanto, demostrar que las células cancerosas secretan NGF, mientras que las células epiteliales correspondientes no cancerosas no lo secretan.

65

ES 2 324 818 T3

Ejemplo 2

Demostración de la expresión de NGF 3 en las células de cáncer de mama mediante inmunotransferencia

5 2.1 Células ensayadas

Las células ensayadas son las indicadas en el punto 1.1 anteriormente.

10 2.2 Inmunotransferencia

10 Las células subconfluentes, cultivadas como se ha indicado en el punto 1.1 anteriormente, se aclararon y colocaron en un medio sin suero que contenía fibronectina y transferrina durante 24 h. Después de privarlas de nutrientes, las células se recogieron mediante raspado en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se sometieron a un centrifugado (1000 x g, 5 min).

15 El sedimento se trató con tampón de lisis (SDS al 10%, 0,5% de β -mercaptoetanol, Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 25% de glicerol, 0,5%) y se llevó a ebullición durante 5 minutos a 100°C.

20 Después del centrifugado (1000 x g, 5 min), se buscaron las proteínas de los sobrenadantes utilizando los ensayos de determinación de proteínas de Bio Rad.

Se sometieron a SDS-PAGE los lisados procedentes de cada línea celular y de la glándula submaxilar, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia (200 mA, 45 minutos).

25 A continuación se ensayó cada membrana con un anticuerpo policlonal de conejo anti-NGF (sc-548, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, Francia) a 4°C durante una noche. Se aclaró cada membrana tres veces con tampón TBS-T y después se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h con un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo acoplado a peroxidasa de rábano rústicano (Molecular Probes). Se aclaró cada membrana cuatro veces con tampón TBS-T y se reveló la reacción utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia Biotech) con la película AR X-Omat de Kodak.

30 También es ese caso, como se representa en la figura 1B, se detectó NGF con las células cancerosas y la glándula submaxilar (banda a 14 kDa), mientras que esta banda estaba ausente para las células no cancerosas.

35 Este resultado confirma el del ejemplo 1.

Ejemplo 3

40 *Demostración de la expresión de NGF en células de cáncer de mama mediante ELISA*

3.1 Células ensayadas

Las células ensayadas son las indicadas en el punto 1.1 anteriormente.

45 3.2 ELISA

Para este ensayo, se utilizó un ensayo con dos sitios para β -NGF humano. En resumen, se recubrieron inmunoplasmas de 1 μ g/ml con anticuerpo monoclonal de captura (R&D Systems, Reino Unido) diluido en un tampón de dilución (BSA al 0,1%, Tween 20 al 0,005% en una solución salina tamponada con Tris pH 7,3). Los pocillos de control se recubrieron con la misma cantidad de IgG de ratón (R&D Systems). Cada pocillo recibió 100 μ l de esta dilución y las placas se sembraron e incubaron a temperatura ambiente, durante una noche.

55 Se lavaron los pocillos tres veces con 400 μ l de PBS, pH 7,4, que contenía el 0,05% de Tween 20. A continuación se bloquearon las placas a temperatura ambiente utilizando el 1% de albúmina de suero bovino, el 5% de sacarosa y el 0,005% de NaN_3 en el mismo tampón.

60 Después de 2 h, se lavaron cuatro pocillos, se aplicaron diluciones de productos desconocidos y patrones en un volumen de 100 μ l y se recubrieron las placas con una banda adhesiva y se incubaron a temperatura ambiente durante una noche.

Se utilizó β -NGF humano (R&D Systems) como muestra patrón a razón de 0,25 a 8 ng/ml en 10 μ l de tampón de dilución.

65 A continuación se lavaron las placas de forma exhaustiva y se añadió el anticuerpo de detección IgG de cabra específico anti- β -NGF humano (BAF-256, R&D Systems) a razón de 50 ng/ml antes de la incubación durante 2 h a temperatura ambiente.

ES 2 324 818 T3

Después de la incubación, se lavan las inmunoplasmas tres veces con tampón de lavado y se añaden 100 μ l de estreptavidina/peroxidasa de rábano rusticano para una incubación de 20 min a temperatura ambiente.

5 La reacción comenzó mediante la adición de 100 μ l de una solución sustrato durante 30 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad.

Después de este periodo, se añadieron 50 μ l de una solución de interrupción (H_2SO_4 1 M) en cada pocillo. Se determinó la densidad óptica en 30 minutos utilizando un conjunto de lectura de microplacas a 595 ó 450 nm.

10 Los resultados de densidad óptica (media de 3 ensayos independientes) se dan en la figura 1C. Demuestran un nivel similar de NGF en todas las líneas de células de cáncer de mama ensayadas.

Ejemplo 4

15 *Cultivo de células sensibles a NGF*

Para ello, se co-cultivaron células que se desarrollan en presencia de NGF, a saber células PC12, con células de cáncer de mama MCF-7, tal como se describen en el punto 1.1 anteriormente, o bien con células NBEC, tal como se han descrito en el punto 1.1 anteriormente, como control.

20 Las células PC12 se cultivaron previamente a 37°C en una atmósfera al 5% de CO_2 , en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 3 g/l de bicarbonato sódico, 4 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal de ternero, 5% de suero de caballo y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomycinina.

25 El co-cultivo se realizó con placas de policarbonato tratado con el cultivo tisular Transwell® (12 mm de diámetro y 12 μ m de tamaño de poro). Se observó un periodo de equilibrio inicial añadiendo los medios al pocillo central de la placa y después al inserto del Transwell®, operación seguida de una incubación a 37°C durante 3 h.

30 Las células PC12 se sembraron en placas de 12 pocillos recubiertas con colágeno durante 24 h para asegurar una fijación correcta a las placas de cultivo. Se sembraron las células MCF-7 o NCBE en el interior del inserto del Transwell®, correspondiente al compartimento superior en el medio completo durante 24 h.

35 Después de este periodo se aclaró cada línea celular tres veces con un medio desprovisto de suero y se incubaron en un medio de retirada. En los experimentos de control, el medio se suplementó con medio que contenía NGF o un inhibidor de la actividad tirosina quinasa trk (K-252-a, Calbiochem, Francia) o anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -NGF humano (MAB-256, R&D Systems).

40 El co-cultivo se realizó durante 48 h. Después de este periodo, las células PC12 se fijaron con metanol frío (-20°C) durante 20 minutos y después se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes del ensamblaje con los cubreobjetos y Glycergel (Dako, Francia).

45 Se contó el porcentaje de células portadoras de neuritos definidas como células con una o más prolongaciones neuríticas que tienen al menos dos veces la longitud del cuerpo de la célula. También se tomaron fotomicrografías con ayuda de un microscopio de contraste de fases suplementado con una cámara digital óptica Olympus.

Los resultados se dan en la figura 2, en la que:

- la figura 2A muestra el esquema experimental donde (2) corresponde a las células cancerosas o no cancerosas y (1) corresponde a las células PC12,

50 - la figura 2B proporciona fotografías donde:

55

- o las fotos 2 y 3 muestran el cultivo de las células PC12 como control, respectivamente sin NGF y en presencia de NGF donde se observa entonces un desarrollo de neuritos debido a la diferenciación,

- o la foto 4, que se refiere al co-cultivo de células MCF-7 y PC12, muestra que las células PC12 se diferenciaron después de 48 h de cultivo,

60

- o la foto 5, que se refiere al co-cultivo de células MCF-7 y PC12 en presencia del anticuerpo anti-NGF, muestra una inhibición fuerte de la diferenciación de las células PC12 debido al anticuerpo,

- o la foto 6, que se refiere al co-cultivo de células MCF-7 y PC12 en presencia del inhibidor K-252a, muestra una inhibición fuerte de la diferenciación de las células PC12 debido al inhibidor, y

65

- o la foto 7, que se refiere al co-cultivo de células normales NBEC y PC12, demuestra la ausencia de diferenciación de las células PC12.

ES 2 324 818 T3

Ejemplo 5

Inmunohistoquímica para la detección de NGF en las biopsias de cáncer de mama

5.1 Extracción y fijación de las biopsias

Inmediatamente después de la operación, las biopsias del tejido de cáncer de mama humano o de tejido sano no canceroso (control) se fijaron mediante una solución de formol al 10% durante 24 horas. Después de la deshidratación mediante baños de alcohol a concentración creciente (del 30 al 100%), las muestras se incluyeron en parafina. Los cortes se realizaron con ayuda de un microtomo (corte fino de 5 micrómetros) y después se fijaron en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropiltriethoxisilano (TESPA, Dako Francia).

5.2 Desparafinado de los portaobjetos

Se desparafinaron los portaobjetos sumergiendo los portaobjetos en baños de acuerdo con el siguiente modo operatorio:

- 2 baños de tolueno (10 minutos),
- 1 baño de alcohol al 100% (10 minutos),
- 1 baño de alcohol al 95% (10 minutos),
- 1 baño de alcohol al 70% (10 minutos),
- 1 baño de agua (10 minutos).

A continuación, se conservaron los portaobjetos a +4°C.

5.3 Marcado de NGF

Se aclararon los cortes con TBS-Tween al 0,1% (TBS: 17,54 g de NaCl, 2,42 g de Trisbase, csp 2 litros de agua, pH 7,4) durante 10 minutos en agitación. Se reactivaron los antígenos mediante tampón citrato 0,01 M (1,05 g de ácido cítrico monohidratado, csp 500 ml de agua destilada, pH 6 (NaOH)) 2 veces durante 5 minutos en un baño maría a 95°C. Se procedió a una incubación de los portaobjetos durante 5 minutos en agitación en el 3% de agua oxigenada/TBS. Se saturaron los portaobjetos durante una hora a temperatura ambiente en TBS/BSA al 3%.

A continuación se procedió a una incubación de los portaobjetos durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda con 80 µl de anticuerpo primario anti-NGF (Santa Cruz, Tebu Francia) diluido a 1/50 en TBS/BSA al 3%. Se lavaron 3 veces en TBS/Tween durante 5 minutos con agitación.

A continuación se procedió a una nueva incubación de los portaobjetos durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda con 80 µl de anticuerpo secundario de mono anti-IgG de conejo, habiéndose unido dicho anticuerpo a la peroxidasa de rábano rusticano (Jackson Laboratories, US), diluida a 1/100 en TBS/BSA al 3%.

Se lavaron los portaobjetos tres veces en TBS/Tween durante 5 minutos con agitación, se aclararon tres veces con PBS durante 5 minutos con agitación, se secaron y después se incubaron durante 10 minutos con 100 µl de DAB (sigma fast 3,3-diaminobencidina; 1 pastilla de DAB + 1 pastilla de urea H₂O₂ en 1 ml de agua).

Se verificó la tinción al microscopio y se interrumpió en un baño de PBS. Se realizó una contra-tinción para visualizar las estructuras mamarias sumergiendo en hematoxilina de Harris en solución modificada (Sigma) durante 4 s. Se aclaró en agua básica y después en un baño de PBS.

Se montó el portaobjetos en glycergel calentado al baño maría a 50°C.

Se fotografiaron los portaobjetos por medio de una lupa binocular (Zeiss).

Las fotos de inmunohistoquímica de los cortes obtenidos de este modo se representan en la figura 3. Las fotos A y B se refieren al tejido normal, respectivamente con o sin marcado con NGF. Las fotos C a F se refieren al tejido canceroso, las fotos C y E se refieren a los cortes sin marcado con NGF (control negativo) y las fotos D y F se refieren a los cortes con marcado con NGF. La barra de calibrado representa 250 micrómetros para las fotos A, B, E y F o 600 micrómetros para las fotos C y D.

Los resultados muestran claramente que el NGF se detecta mediante inmunohistoquímica en los portaobjetos de biopsia en las células epiteliales de cáncer de mama, pero no en las células epiteliales mamarias normales (células epiteliales marcadas con anticuerpo anti-NGF, y debido a esto teñidas, en las glándulas mamarias tumorales en D y F con respecto a C y E y no en las glándulas mamarias normales en B con respecto a A).

ES 2 324 818 T3

Ejemplo 6

Detección de NGF en las células tumorales mediante citometría de flujo

5 Se despegaron las células MCF-7 raspando el fondo de la placa de cultivo. A continuación se añadieron 100 μ l de fijador (Coulter) con una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las células tres veces con PBS y se centrifugaron a 1900 rpm durante 5 minutos.

10 Se añadieron 100 μ l de permeabilizante (Coulter) y después se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 20 μ l del anticuerpo monoclonal de ratón anti-NGF no marcado (R&D Systems, diluido a la 100^a) y después se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

15 A continuación se lavaron las células tres veces con PBS y se centrifugaron a 1900 rpm durante 5 minutos.

Se añadieron 20 μ l del 2^o anticuerpo anti-ratón marcado FITC (R&D Systems, diluido a 1/50) y después se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

20 A continuación se lavaron las células tres veces con PBS y se centrifugaron a 1900 rpm durante 5 minutos.

Las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS y después se realizó la lectura con un citómetro de flujo (Beckman Coulter[®] EPICS[®]).

25 Los resultados obtenidos muestran que más del 30% de las células de esta línea celular contienen NGF dentro del citoplasma.

Dicho método es aplicable con células tumorales aisladas de una muestra biológica.

30 Ejemplo 7

Influencia de un anticuerpo anti-NGF y de un inhibidor farmacológico sobre el crecimiento de las células cancerosas

35 Se estudiaron el efecto del anticuerpo de bloqueo MAB-256 (*supra*) y del inhibidor K-252a sobre el crecimiento de las células MCF-7. Para ello, se sembraron las células a razón de 2×10^4 células/ml en placas de 35 mm en medio completo. Después de alcanzar el 40% de confluencia, se lavaron las células dos veces y se dejaron sin nutrientes en un medio desprovisto de suero que contenía fibronectina (2 μ g/ml) y transferrina (30 μ g/ml) durante 3 h. Una hora después, se sustituyó el medio por 2 ml del mismo medio que contenía el inhibidor K-252a o el anticuerpo MAB-26 a diferentes concentraciones para estudiar el efecto del inhibidor farmacológico o del inhibidor de bloqueo sobre el nivel basal de crecimiento.

40 Después de 24, 36, 48 y 72 h de tratamiento, se determinó el número de células después de la tripsinización del cultivo en monocapa con una solución de tripsina al 0,25%/EDTA utilizando un hemocitómetro.

45 También se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-ratón (A4700, SIGMA), es decir no pertinente, para determinar la especificidad del anticuerpo de bloqueo.

Los resultados se indican en la figura 4 en la que:

50 - la figura 4A muestra que el crecimiento de las células MCF-7 en medio de base (cuadros) disminuye en presencia de anticuerpo (triángulos) y de inhibidor (rombos),

- las figuras 4B y 4C muestran que hay un efecto dependiente de la dosis de anticuerpo y de inhibidor, respectivamente, sobre el efecto proliferativo de NGF para las células cancerosas.

55 El NGF puede utilizarse por lo tanto como una buena diana terapéutica.

Ejemplo 8

Efecto de los anticuerpos anti-NGF sobre la tumorigénesis de las células mamarias in vivo

Se estudió el crecimiento de las células de cáncer de mama MDA-MB.231 de la siguiente manera:

65 Se realizó una inyección subcutánea en el costado de 30 ratones SCID (*Severe Combines Immuno-Deficiencia*) a tiempo 0 (D0) de 3×10^6 células MDA-MB-231 obtenidas de cultivos *in vitro*, en 50 microlitos de PBS por ratón. Se mantuvieron los ratones en condiciones de cría convencionales a temperatura ambiente, con alternancia día/noche y acceso sin límite a bebida y alimento.

ES 2 324 818 T3

Catorce, 21 y 28 días después de la inyección de las células, se inyectaron a la mitad de los ratones anticuerpos de bloqueo anti-NGF humanos (Oncogene Research Product, VWR Francia) en la periferia del tumor (subcutánea a nivel del costado a 1 cm del punto de inyección de las células tumorales) a la concentración de 12,5 microgramos en 50 microlitos de tampón PBS por ratón.

5

Se midió el tamaño de los tumores, en los ratones vivos, tratados o no con el anticuerpo anti-NGF, con un calibre “pie de rey” electrónico 21 y 35 días después de la inyección de las células cancerosas (D21 y D35, respectivamente). El volumen del tumor se calculó con la siguiente fórmula: $0,5236 \times \text{longitud (mm)} \times \text{anchura (mm)} \times (\text{longitud} + \text{anchura})/2$.

10

También se midió el peso de los tumores el D35 en estos mismo ratones, después de sacrificar el animal, con ayuda de una balanza de precisión electrónica.

15

Finalmente se contó macroscópicamente el número de metástasis en el hígado.

Los respectivos resultados de las anteriores mediciones (media) se indican en los gráficos de la figura 5 donde el histograma rayado corresponde a los ratones no tratados con el anticuerpo anti-NGF (controles) y el histograma sin rellenar corresponde a los ratones tratados con dicho anticuerpo.

20

Estos gráficos demuestran que los tratamientos con un anti-NGF conllevan una disminución de la masa y del volumen tumoral, así como del número de metástasis en el marco del cáncer de mama.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de cáncer de mama, **caracterizado** porque consiste en determinar la presencia de NGF en una muestra biológica obtenida de un paciente sospechoso de padecer cáncer de mama.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la presencia de NGF se demuestra mediante detección directa de NGF en dicha muestra biológica.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque la detección de NGF se realiza mediante un ensayo inmunológico o mediante espectrometría de masas.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizado** porque dicha muestra biológica está constituida por fluido biológico o por un tejido procedente de la biopsia del tumor o de metástasis.
- 15 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** porque la muestra biológica está constituida por un tejido procedente de la biopsia del tumor o de metástasis del paciente.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** porque la muestra biológica está constituida por fluido biológico, preferentemente tratado previamente para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.
- 20 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque las células tumorales circulantes se cultivan a continuación en condiciones tales que secreten NGF.
- 25 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7, **caracterizado** porque las células tumorales circulantes también se cultivan en condiciones que permitan el bloqueo de NGF en el interior de dichas células.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la detección de NGF se demuestra mediante cultivo, en presencia de dicha muestra biológica, de células sensibles a NGF.
- 30 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque dicha muestra biológica está constituida por una muestra de fluido biológico, preferentemente tratado previamente para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.
- 35 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque las células tumorales circulantes se cultivan a continuación en condiciones tales que secreten NGF.
- 40 12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la detección de NGF se demuestra mediante detección del ARNm de NGF en dicha muestra biológica.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado** porque dicha muestra biológica está constituida por una muestra de fluido biológico o por un tejido procedente de la biopsia del tumor o de metástasis del paciente.
- 45 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado** porque la muestra biológica está constituida por un tejido procedente de la biopsia del tumor o de metástasis del paciente.
- 50 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado** porque la muestra biológica está constituida por fluido biológico, preferentemente tratado previamente para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.
- 55 16. Utilización del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el diagnóstico precoz, cribado, seguimiento terapéutico, pronóstico y diagnóstico de recaídas en el marco del cáncer de mama.

60

65

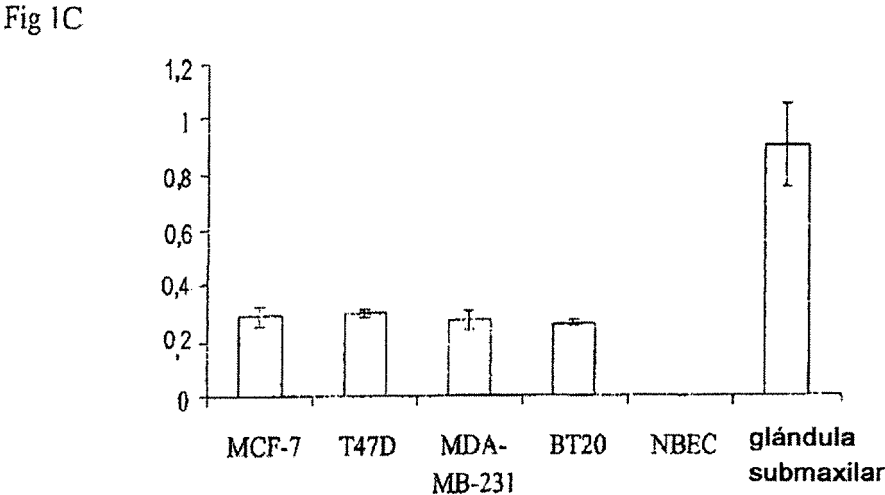
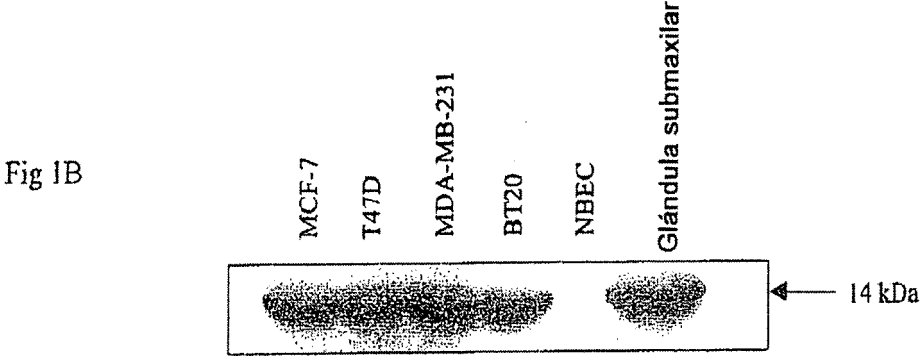
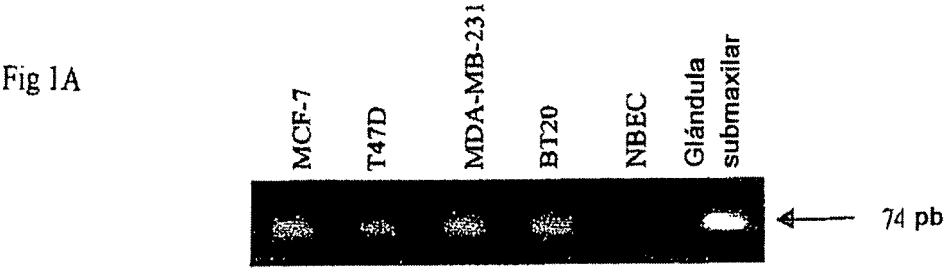


Figura 1

Fig 2A

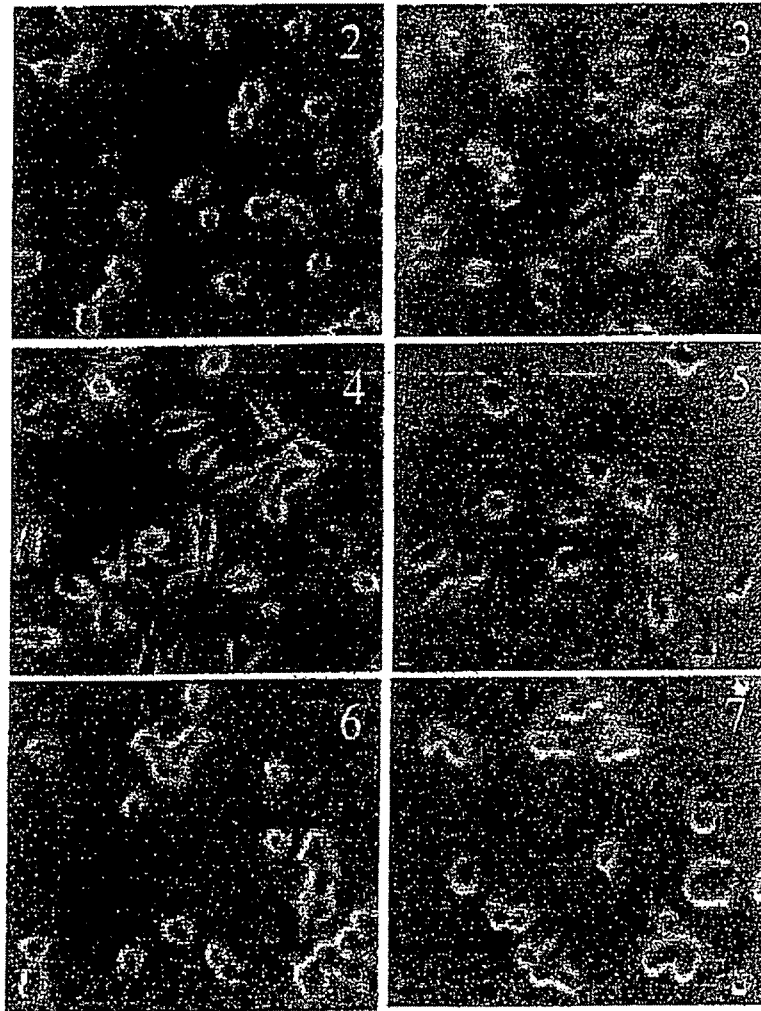
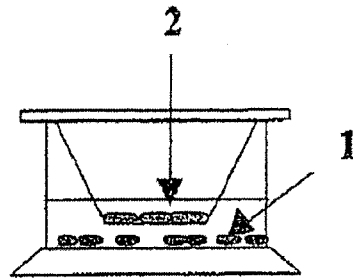


Fig 2B

Figura 2

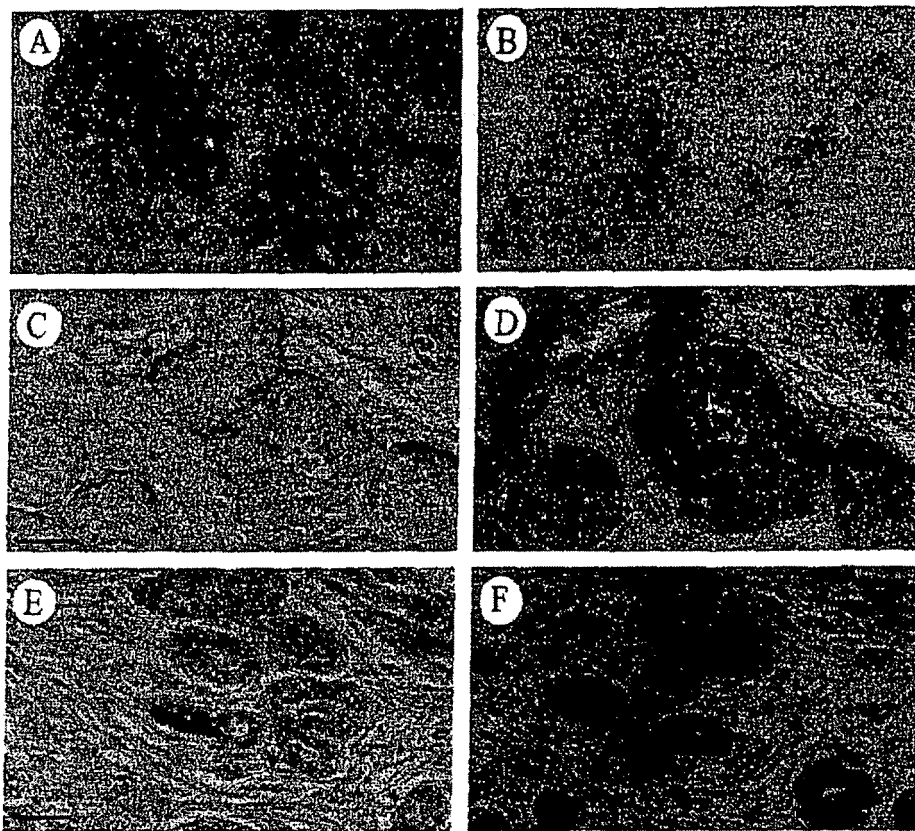


Figura 3

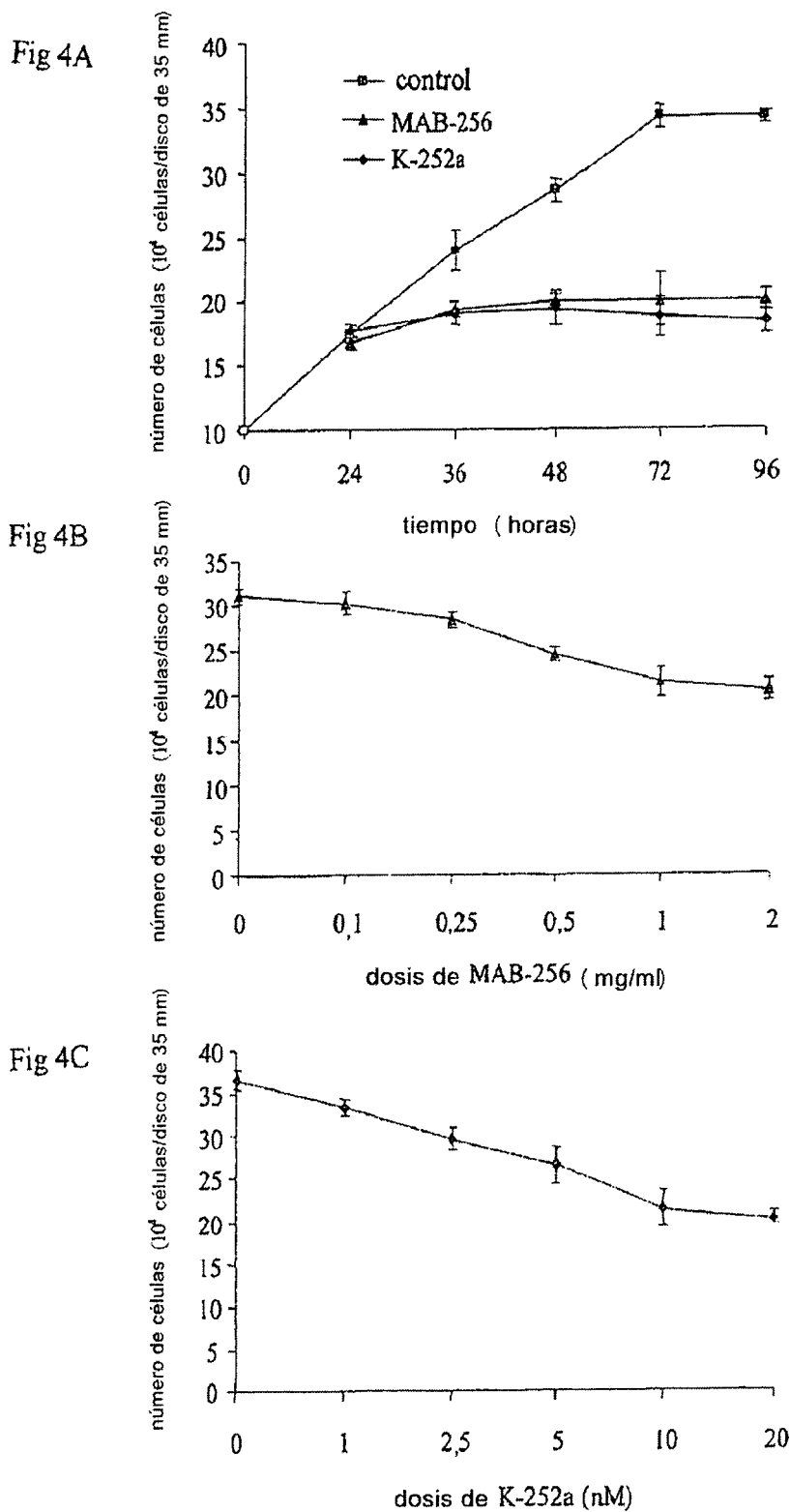


Figura 4

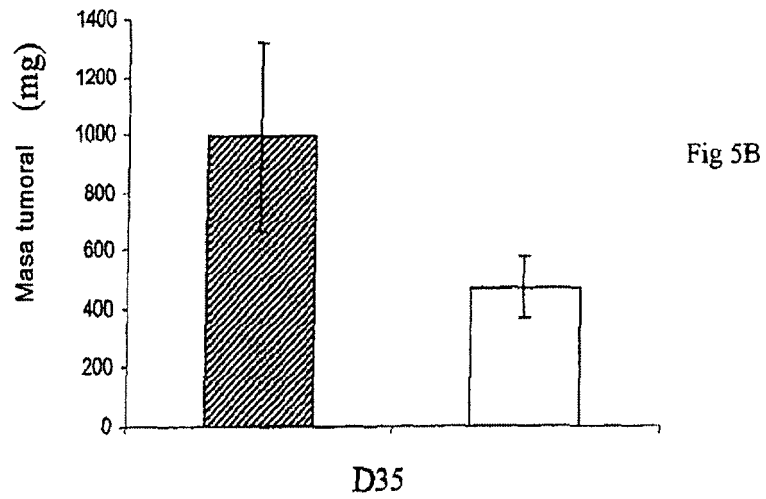
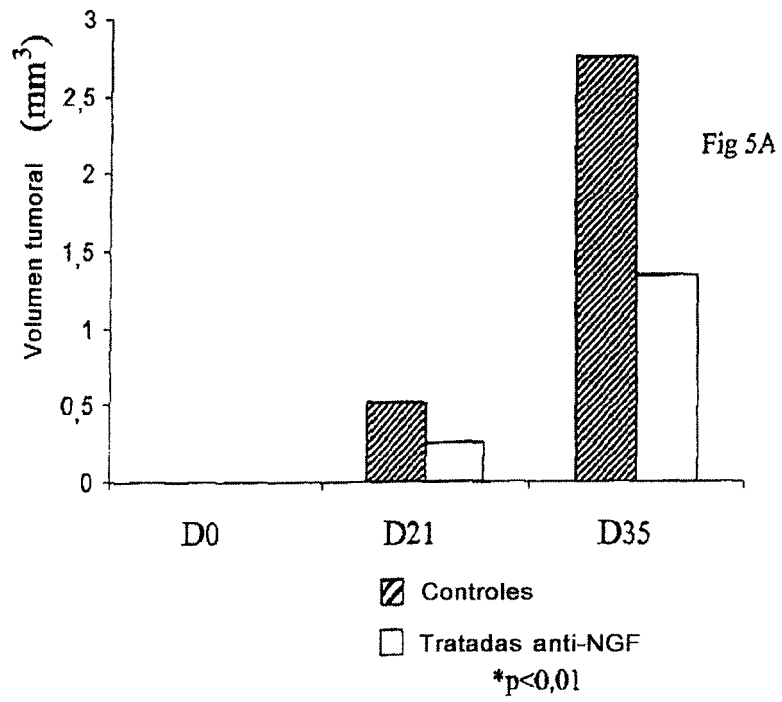


Figura 5

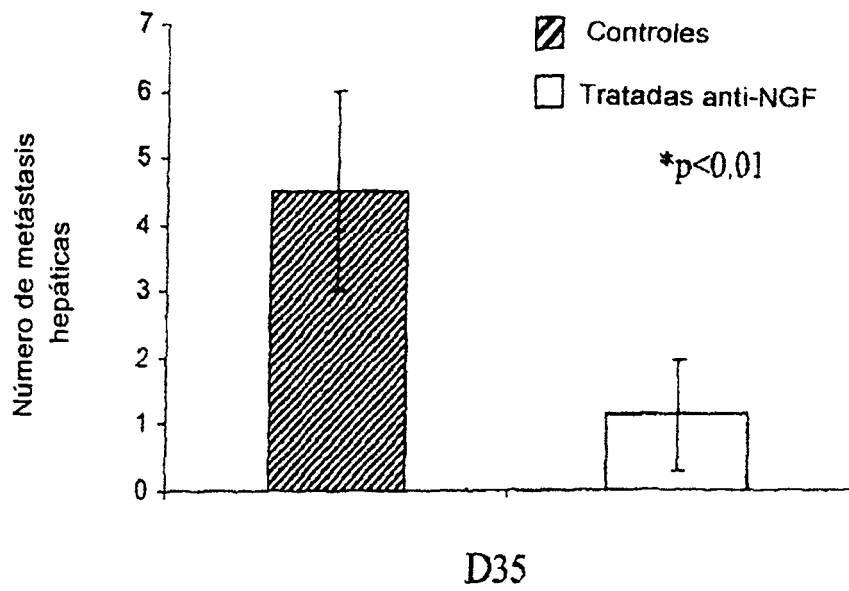


Fig 5C

Figura 5 (Continuación)