

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 126**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2007 E 07731536 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1982192**

54 Título: **Procedimiento de ensayo del ProNGF para el diagnóstico in vitro del cáncer, en particular del cáncer de mama, de tiroides, de la próstata o de pulmón, y utilización del proNGF en terapia**

30 Prioridad:

31.01.2006 FR 0600851

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

25.06.2014

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX S.A. (50.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile, FR y
UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE SAIC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHOQUET-KASTYLEVSKY, GENEVIÈVE;
DEMONT, YOHANN y
HONDERMARCK, HUBERT**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 471 126 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 ensayo del ProNGF para el diagnóstico *in vitro* del cáncer, en particular del cáncer de mama, de tiroides, de la próstata o de pulmón, y utilización del proNGF en terapia

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 y más particularmente del cáncer de mama, de tiroides, de pulmón o de la próstata, en un paciente humano mediante determinación *in vitro* de la presencia del precursor del factor de crecimiento nervioso (ProNGF) en una muestra biológica procedente de este paciente, o en el tumor del paciente *in vivo*, pudiendo ser utilizado dicho procedimiento tanto en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico, como en el diagnóstico de recaídas en el ámbito del cáncer. Además, debido a la capacidad de las células del cáncer, y más particularmente del cáncer de mama, de tiroides, de pulmón o de la próstata para producir ProNGF, la presente invención se refiere también a la terapia.

15 En la mujer, el cáncer de mama es la primera causa de mortalidad por cáncer en los países desarrollados. Se estima que el tamaño mínimo de un tumor detectable por mamografía es de algunos milímetros (mm). Los cánceres de mama se desarrollan lentamente. Sin embargo, este tumor de pequeño tamaño presenta un pasado evolutivo de 8 años de media durante el diagnóstico. La etiología del cáncer de mama no está bien definida. Se han puesto en evidencia unas predisposiciones familiares. La edad es el factor de riesgo más importante. Así, el riesgo aumenta el 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 estrogénicos después de la aparición de la menopausia, el estrés y la nutrición.

20 El ensayo disponible y utilizado en la detección masiva del cáncer de mama es una técnica de procesamiento de imágenes: la mamografía. Gracias a esta técnica, la mortalidad debida a los cánceres de mama ha disminuido enormemente (del 30% de reducción de la mortalidad), lo que subraya la importancia de la detección de los tumores en términos de salud pública. Sin embargo, las técnicas de detección sufren un cierto número de obstáculos. La mamografía necesita un material con buen rendimiento y un personal cualificado, lo que es costoso en el marco de una detección masiva.

25 El cáncer de tiroides es un cáncer raro. Representa aproximadamente el 1% de los cánceres que aparecen en la población general en Francia. Su incidencia anual es baja, es decir aproximadamente el 2,5 por 100.000 personas (Cancers: évaluation, traitement et surveillance. JM Andrieu & P Colonna Ed. ESTEM, Paris 1997). El número de nuevos casos de cáncer de tiroides en los Estados Unidos en 2006 se estimó en 30.000, y los fallecimientos en 1500 (American Cancer Society.: Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2006).

30 El cáncer de tiroides se desarrolla habitualmente en forma de un nódulo situado dentro de la glándula tiroides, ya sea de tamaño normal o aumentado (bocio). Es un cáncer raro, más frecuente en los sujetos jóvenes, y cuyo pronóstico es bueno cuando el cáncer está en su forma papilar ya que la curación se produce en el 90% de los casos.

35 La prevalencia del nódulo tiroideo es variable según los medios de detección. Es más frecuente en la mujer, el sujeto mayor, los sujetos que viven en una zona de carencia de yodo o que han sufrido una irradiación de la región cervical durante la infancia, pero estos nódulos son benignos en más del 90% de los casos. Los sujetos jóvenes están más expuestos al desarrollo del cáncer debido a una mayor sensibilidad de la tiroides a la irradiación.

40 Según la clasificación histológica internacional, se distinguen cuatro tipos histológicos principales de carcinoma de la tiroides:

- Los epitelomas papilares,
- Los epitelomas vesiculares (o foliculares, término anglosajón),
- Los epitelomas medulares,
- Los epitelomas anaplásicos (o indiferenciados).

45 Estos tumores pueden ser solitarios o multifocales.

Los cánceres papilares son los más frecuentes. Predominan en los sujetos jóvenes y representan aproximadamente el 80% de los cánceres tiroideos.

Los cánceres vesiculares representan aproximadamente el 10% de los cánceres tiroideos y son sobretodo frecuentes alrededor de la cuarentena.

50 Los cánceres papilares y vesiculares representan el grupo de los cánceres tiroideos diferenciados radiosensibles. Segregan Tiroglobulina.

Los cánceres medulares representan el 5% de los cánceres tiroideos y corresponden a un tumor de las células C o parafoliculares procedentes de la cresta neural. Las células C segregan la calcitonina.

Los cánceres anaplásicos o indiferenciados son raros (menos del 5% de los casos) y de una gravedad extrema.

En presencia de un nódulo tiroideo maligno, el tratamiento de base es la cirugía.

- 5 Si persiste un tejido funcional residual, se administra una dosis de yodo 131 en cámara aislada, 4 a 6 semanas después de una tiroidectomía total, a fin de esterilizar totalmente.

El cuarenta por ciento aproximadamente de las metástasis de los cánceres tiroideos fijan el yodo y pueden por lo tanto ser tratados por este método.

- 10 Después de la tiroidectomía total y de la esterilización de la tiroides por yodo 131, se administra la tiroxina, hormona inhibidora de la secreción de la TSH. Esta hormonoterapia permite también asegurar un equilibrio tiroideo satisfactorio sobre el plano funcional. El descubrimiento de nuevos marcadores de diagnóstico, pronóstico y de una terapéutica dirigida, podría permitir complementar el arsenal terapéutico y diagnóstico de este cáncer.

- 15 Responsable de más de 25.000 nuevos casos cada año en Francia, el cáncer de pulmón puede ser considerado como un problema principal de salud pública. El cáncer más frecuente en el hombre, representa en efecto la primera causa de mortalidad por cáncer en el hombre y la tercera en la mujer. El número de nuevos casos de cáncer de pulmón (de células no pequeñas y con pequeñas células combinadas) en los Estados Unidos en 2006 se estimó en 174.470, y los fallecimientos en 162.460 (American Cancer Society.: Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2006).

- 20 En el interior de los cánceres primitivos, el examen de las células cancerígenas (examen anatomopatológico) permite distinguir:

- los cánceres epidermoides (35-40%);
- los adenocarcinomas (25-35%);
- los carcinomas de grandes células (10-15%);
- los carcinomas de pequeñas células (20-25%).

- 25 Estas cuatro categorías representan cerca del 95% de los cánceres de pulmón. Las tres primeras están agrupadas en "carcinoma de células no pequeñas" (Non small cell lung cancer, NSCLC).

El cáncer de pequeñas células evoluciona mucho más rápidamente y es más susceptible de extenderse a otros órganos. Más raros, los tumores carcinoides y los tumores muco-epidermoides representan del 1 al 2% restante.

- 30 Se pueden resumir estas clasificaciones en "cáncer de pulmón de pequeñas células" (13%) o "de células no pequeñas" (87%), con implicaciones terapéuticas diferentes. Los esfuerzos de detección precoz no han demostrado su eficacia con las herramientas actuales (Radio pulmonar, análisis de los esputos, fibroscopía, no mejoran la supervivencia). Es posible que el escáner espiral o los análisis moleculares de los esputos pueda permitir una detección más precoz, con cánceres más fácilmente resecables. Sin embargo, no se ha descubierto aún ninguna herramienta de detección, debido en particular a los riesgos relacionados con las biopsias pulmonares y con la cirugía, sobretudo en los pacientes fumadores. Sin tratamiento, el cáncer de pulmón de pequeñas células es el más agresivo de los tumores pulmonares, con una supervivencia mediana de sólo 2 a 4 meses. Comparado con otros tipos de cáncer de pulmón, el cáncer de pulmón de pequeñas células tiende a la diseminación antes del diagnóstico, pero es más sensible a la quimioterapia y a la radioterapia. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) recubre diferentes histologías. Las histologías más comunes son el carcinoma epidermoide o escamoso, el adenocarcinoma, y el carcinoma de grandes células. Estas histologías están frecuentemente clasificadas juntas por que los enfoques de diagnóstico, de gradación, de establecimiento del pronóstico, y del tratamiento son parecidos. Unos pacientes que presentan un cáncer resecable pueden ser curados por cirugía o cirugía con quimioterapia adyuvante. El control local de la enfermedad puede ser realizado con la radioterapia en un gran número de pacientes con un cáncer no resecable. Los pacientes que presentan una enfermedad localmente avanzada y no resecable pueden tener una supervivencia a largo plazo con radioterapia combinada con la quimioterapia. Los pacientes que presentan la enfermedad metastásica avanzada pueden tener una mejora de los síntomas y de la supervivencia con la quimioterapia.

- 50 Con el diagnóstico, los pacientes con NSCLC pueden ser divididos en 3 grupos de tratamiento similar. El primer grupo de pacientes comprende los tumores quirúrgicamente resecables (generalmente grado I, grado II, y algunos pacientes de grado III). Este grupo tiene el mejor pronóstico. Los pacientes que presentan un cáncer resecable con contraindicaciones médicas a la cirugía son unos candidatos para la radioterapia curativa. El segundo grupo incluye pacientes con un cáncer de pulmón local (T3-T4) y/o regionalmente (N2-N3) avanzado.

El tercer grupo incluye unos pacientes con metástasis a distancia (M1) que se encontraron en el momento del diagnóstico. Este grupo puede ser tratado con radioterapia o quimioterapia paliativa.

Unos estudios múltiples han intentado identificar unos factores pronósticos determinantes (Albain KS, Crowley JJ, LeBlanc M, *et al.*: Survival determinants in extensive-stage non-small-cell lung cancer: the Southwest Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 9 (9): 1618-26, 1991; Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, *et al.*: Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106 (1): 80-9, 1993; Ichinose Y, Yano T, Asoh H, *et al.*: Prognostic factors obtained by a pathologic examination in completely resected non-small-cell lung cancer. An analysis in each pathologic stage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (3): 601-5, 1995; Martini N, Bains MS, Burt ME, *et al.*: Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage 1 lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109 (1): 120-9, 1995; Fontanini G, Bigini D, Vignati S, *et al.*: Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 177 (1): 57-63, 1995). Los factores que están correlacionados con un pronóstico desfavorable incluyen lo siguiente:

- presencia de síntomas pulmonares.
- gran tamaño del tumor (>3 centímetros).
- histología no epidermoide.
- metástasis ganglionares en ganglios establecidos por el TNM.
- invasión vascular.

Asimismo, se han detallado unos resultados contradictorios que se refieren a la importancia de pronóstico de la expresión anormal de un cierto número de proteínas en cánceres de pulmón. Para unos pacientes que presentan un cáncer inoperable, el pronóstico está comprometido por un mal estado general y una pérdida de peso de >10%.

Puesto que el tratamiento no es satisfactorio para casi todos los pacientes con NSCLC, es necesario descubrir nuevas dianas terapéuticas, y nuevas herramientas de diagnóstico precoz.

El cáncer de la próstata es el cáncer más frecuente en el hombre de más de 50 años y representa la segunda causa de fallecimiento por cáncer del hombre en el mundo desarrollado, después del cáncer de pulmón.

Su incidencia aumenta con la edad. En Francia, la incidencia global en 1990 era de 71,4 para 100.000 (2,6 en el tramo 35-49 años; 133,8 en el tramo 50-69 años; 726,9 en el tramo de los 70 años). La edad media del cáncer de la próstata se sitúa alrededor de 70 años, pero algunos hombres lo padecen a una edad más temprana.

El aumento del 23% de la mortalidad relacionada con el cáncer prostático, en los últimos veinte años, refleja el aumento de la esperanza de vida y el reconocimiento más frecuente del cáncer de la próstata como causa principal del fallecimiento. En Francia, la mortalidad global por cáncer era de 33,4 para 100.000 en 1990, es decir más de 9000 fallecimientos por año. El cáncer de la próstata representa el 3,4% de todos los fallecimientos y el 10,7% de los fallecimientos por cáncer.

El cáncer de la próstata se desarrolla frecuentemente muy lentamente, y al principio permanece localizado. Cuando el cáncer evoluciona, puede extenderse fuera de la próstata por invasión directa de los tejidos y de los órganos situados cerca de la próstata, y puede dispersarse a otros órganos a distancia de la próstata.

El antígeno prostático específico (PSA) es un marcador tumoral utilizado para la detección del cáncer de la próstata. El porcentaje de PSA en la sangre está expresado en nanogramos por mililitros (ng/ml) y se considera como normal si el índice es inferior a 4 ng/ml. Cuanto más elevado sea el índice de PSA en caso de cáncer de la próstata, más elevado es el riesgo de una extensión a distancia del cáncer, lo que significa habitualmente una disminución de las posibilidades de curación o de supervivencia a largo plazo. Sin embargo, el PSA no es el marcador ideal: en efecto, algunos cánceres detectados por un índice de PSA aumentado podrían haber tenido una evolución muy lenta, sin necesitar tratamiento. Por lo tanto es indispensable descubrir nuevas herramientas de diagnóstico (a nivel tisular o a nivel de los fluidos biológicos), a fin de detectar precisamente los cánceres de potencial agresivo, para diferenciarlos de los cánceres de evolución muy lenta.

Para precisar el diagnóstico, se utiliza la ecografía endorrectal de la próstata, que puede guiar muy precisamente una aguja para realizar unas extracciones en un sitio determinado de la próstata. Sólo la biopsia puede confirmar el cáncer, ya que las células cancerígenas son visibles al microscopio. Las biopsias tienen por lo tanto una importancia primordial para determinar el pronóstico de la enfermedad.

El tratamiento de referencia es la prostatectomía total. Esta operación quita toda la próstata y las vesículas seminales. Se realiza sólo si el cáncer no supera los límites de la próstata. Aproximadamente el 10% de los pacientes desarrollaron una recidiva local en los 5 años después de una prostatectomía radical para un cáncer de próstata localizado.

La radioterapia se utiliza para tratar los cánceres localizados a la próstata, o que han alcanzado los tejidos próximos. Se puede utilizar para disminuir el volumen del tumor o evitar complicaciones locales.

5 El objetivo del tratamiento hormonal es oponerse a la acción de las hormonas masculinas (andrógenos) que estimulan la próstata. Así, la disminución del índice de testosterona, principal hormona masculina, bloquea la proliferación de las células cancerígenas y disminuye el volumen de la próstata. El tratamiento hormonal tiene sólo un efecto transitorio, bloquea la proliferación del cáncer sin curarlo.

La quimioterapia se utiliza en el cáncer de próstata cuando éste ha evolucionado con una extensión extraprostática y que no responde más al tratamiento hormonal. La quimioterapia disminuye el crecimiento tumoral y puede disminuir los dolores relacionados con el cáncer.

10 Los tratamientos citados anteriormente pueden tener un cierto número de efectos secundarios, entre ellos una incontinencia urinaria, una impotencia, unos trastornos intestinales (diarrea, colitis) y trastornos urinarios que aparecen esencialmente durante el tratamiento (frecuencia urinaria, disminución del chorro, necesidad urgente, quemaduras orinando, presencia de sangre en la orina). El tratamiento hormonal a largo plazo puede conllevar una osteoporosis con fragilización ósea.

15 Nuevas terapéuticas dirigidas podrían permitir evitar un cierto número de estos efectos secundarios, y mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer de próstata. Nuevas herramientas de diagnóstico y pronóstico podrían permitir diferenciar los cánceres de evolución lenta de los cánceres de potencial metastático, agresivo.

20 En la práctica clínica, la caracterización de un tumor en términos de malignidad se realiza después de su descubrimiento mediante métodos histológicos en laboratorios especializados. Se utiliza un conjunto de parámetros tales como el tamaño del tumor, su grado histopatológico, la inflamación asociada y la invasión de los ganglios para decidir la terapéutica y para estimar el pronóstico de la enfermedad.

25 Desde hace unos años, para numerosos cánceres, entre ellos el cáncer de mama, de tiroides, de los pulmones y de la próstata, se investigan y estudian unos marcadores que permitan distinguir las células tumorales de las células sanas. Permitirían diagnosticar precozmente la enfermedad, establecer el pronóstico y la sensibilidad al tratamiento, y vigilar la evolución. Hasta ahora, los marcadores candidatos que han identificados y estudiados han sido unos oncógenos, unos marcadores tisulares y unos marcadores asociados a la angiogénesis o a las capacidades metastásicas del tumor. Actualmente, los marcadores de cáncer de mama identificados sirven principalmente para el seguimiento terapéutico. No existe ningún ensayo biológico válido para el diagnóstico precoz, ni para la detección del cáncer de mama, ni para numerosos otros cánceres (para la detección de masa del cáncer colorrectal, se dispone de la detección de hemoglobina en las heces). El PSA puede ser utilizado para ayudar al diagnóstico, e indicar la necesidad de una biopsia prostática en el caso del cáncer de la próstata. La determinación inmunológica de la calcitonina en el plasma es un excelente marcador de los cánceres medulares de tiroides. En algunos países, se puede utilizar para la detección del cáncer de la próstata, pero no es válido en una base de población en esta indicación. Sólo la detección de los receptores de los estrógenos sobre el tejido tumoral mamario permite determinar si los tumores de mama serán o no hormonossensibles. La detección del receptor HER-2/neu en los cánceres de mama permite saber si el tumor es sensible a la herceptina.

30

35

Un número limitado de marcadores antigénicos, en particular el 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, 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 identificó en el caso de las células mamarias cancerígenas. Este marcador se utiliza en la práctica habitual para el seguimiento de los pacientes, en particular para la detección de recidiva, pero, debido a su baja sensibilidad, no es propuesto en ensayo de detección ni de diagnóstico.

40

Desde hace varios años, se han desarrollado unos trabajos que se basan en los antígenos asociados al cáncer de mama, no para buscar marcadores sino para buscar dianas para una inmunoterapia. Estos van desde la puesta en evidencia 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 las células T dirigidos contra p53 (Gnjatic, S., Z. Cai; M. Viguier, S. Chouaib, J. G. Guillet, y 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) 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).

45

50

Más recientemente, se ha puesto en evidencia una serie de nuevos antígenos potenciales mediante el enfoque SEREX (serological expression cloning), que se basa en la construcción de genotecas de ADNc de células tumorales y un screening mediante el suero autólogo. Un screening serológico de genotecas de cáncer de mama permitió así la puesta en evidencia del 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.), y después de un nuevo antígeno de diferenciación *NY-BR-1*, expresado según los autores en el 80% de los

55

cánceres de mama y que inducen la producción de anticuerpo IgG en los pacientes (Jager, D., E. Stockert, A. O. Gure, M. J. Scanlan, J. Karbach, E. Jager, A. Knuth, L. J. 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). Este tipo de enfoque, que sirvió principalmente para la búsqueda de dianas potencialmente utilizables para el desarrollo de vacunas, no excluye aparentemente los antígenos presentes en el tejido normal (es del 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 explotables para una estrategia de detección o de diagnóstico precoz. Mediante el mismo enfoque, se han señalado otros antígenos que inducen una respuesta inmunitaria humoral en pacientes como NY-BR-62, NY-BR-85 y la proteína D52. Estos antígenos estarían sobreexpresados 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 cánceres, y más particularmente de un cáncer de mama implican unas modificaciones de la estructura y de la expresión de oncógenos (tal como *ras*) y de mutaciones de genes supresores de tumores como p53. El crecimiento de las células tumorales en la mayoría 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. El crecimiento de los cánceres de la próstata está bajo la dependencia de los andrógenos. El crecimiento de algunos de los cánceres de tiroides está bajo la dependencia de la "Thyroid Stimulating Hormone (THS)". Estos factores de crecimiento bien estimulan, o bien inhiben la proliferación, la migración y la diferenciación de las células tumorales a fin de actuar juntos para favorecer el crecimiento del cáncer y de las metástasis. Por ejemplo, los factores de crecimiento de tipo insulina, el factor de crecimiento de transformación α (TGF- α) y los factores de crecimiento del fibroblasto (FGF) pueden estimular toda la proliferación de las células del cáncer de mama, mientras que el inhibidor del factor de crecimiento derivado del seno (MDGI) y el factor de crecimiento de transformación β (TGF- β) inhiben su crecimiento.

En la solicitud de patente WO 2004/040312, los solicitantes han descrito la utilización del NGF como marcador tumoral y a título de diana terapéutica. Así, el NGF está producido por las células del cáncer de mama, mientras que unas células epiteliales mamarias normales correspondientes no los producen. Además, el NGF estimula la supervivencia y la proliferación de las células epiteliales mamarias cancerígenas mientras que no tiene efecto en las células epiteliales mamarias normales.

El gen del NGF codifica un precursor proteico denominado ProNGF (26 kDa) que, por escisión enzimática, genera un NGF (13,6 kDa) (Seidah *et al.*, 1996, *Biochem J.*, 314: 951-960). La principal fuente de NGF en los mamíferos es la glándula submaxilar que contiene únicamente un NGF y muy poco ProNGF. Durante mucho tiempo, el único papel concedido al ProNGF era un papel de precursor metabólico con un tiempo de vida muy transitorio.

Más recientemente, se ha demostrado en diferentes tejidos que el ProNGF se encontraba en cantidad frecuentemente superior a la del NGF (Bierl *et al.*, 2005, *Neurosci Lett*, 380: 133-137). Hasan *et al.* han descrito que el ProNGF puede ser segregado, lo que significa que puede potencialmente actuar de manera autocrina, paracrina o incluso endocrina (2003, *J Neurobiol*, 57: 38-53). Finalmente, recientemente, se ha demostrado que el ProNGF posee en la superficie de las células neuronales un sitio de fijación de alta afinidad por el cual tiene efectos propios, distintos de los del NGF. Así, el ProNGF es capaz de unirse a la sortilina, una glicoproteína de 100 kDa (Mazella *et al.*, 1998, *J Biol Chem*, 273: 26273-26276), e inducir la apoptosis de células neuronales *in vitro* (Nykjaer *et al.*, 2004, *Nature*, 427: 843-848). Las solicitudes de patente WO 2004/056385 y WO 2005/076695 muestran que la interacción entre una neurotrofina (NGF o ProNGF) puede ser modulada con la ayuda de compuestos particulares, permitiendo tal modulación el tratamiento de los dolores asociados a ciertas enfermedades genito-urinarias o de pacientes cuyo sistema nervioso está dañado. Se ha atribuido asimismo al ProNGF una actividad pro-apoptótica *in vivo* (Pedraza *et al.*, 2005, *Am J Pathol*, 166: 533-543). Está claro que existe un desacoplamiento a nivel de la expresión y de los efectos biológicos del NGF o del ProNGF que parecen ser diferentes.

De manera más general, los propéptidos se consideraron durante mucho tiempo como siendo únicamente unos precursores metabólicos, un cierto número de ejemplos recientes, en particular en el campo de los neuropéptidos, indican que en algunas situaciones, los propéptidos tienen una actividad biológica propia y desasociada de la del péptido maduro que pueden generar. Este es claramente el caso del ProNGF, que puede ser segregado por la célula, posee sus receptores propios y demuestra tener unos efectos biológicos distintos de los del NGF sobre las neuronas. El ProNGF constituye por lo tanto una entidad molecular y biológica propia y diferente del NGF. Ciertamente, la secuencia del NGF está contenida en la del ProNGF, pero sus puntos isoeléctricos y pesos moleculares son diferentes, así como sus actividades biológicas.

Los solicitantes han puesto en evidencia ahora, de manera sorprendente, que las células epiteliales del cáncer y en particular del cáncer de mama, de tiroides, de pulmón y de la próstata producen y segregan ellas mismas un ProNGF, en una cantidad notable, mientras que unas células epiteliales sanas de los mismos órganos no lo producen, de manera que el ProNGF puede ser utilizado a título de marcador tumoral o bien a título de diana terapéutica. Los solicitantes han establecido asimismo que el ProNGF sobreexpresado en las células cancerosas posee una actividad pro-metastásica para estas células mientras, que el NGF tiene, por su parte, una actividad anti-apoptótica y mitógena.

Así, la presente invención tiene como primer objeto un procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer, y en particular de los cánceres de mama, de tiroides, de pulmón o de la próstata por determinación de la presencia de ProNGF en unas muestras biológicas procedentes de pacientes sospechosos de padecer cáncer y en particular cánceres de mama, de tiroides, de los pulmones o de la próstata.

5 El procedimiento de la invención permite por lo tanto diagnosticar el cáncer, y en particular el cáncer de mama, de tiroides, de pulmón o de la próstata mediante un simple ensayo que consiste en buscar la presencia de ProNGF en una muestra biológica extraída de un paciente, o en el tumor del paciente *in vivo*. Los solicitantes han mostrado de manera inesperada que unas células cancerosas producen un ProNGF, mientras que las células correspondientes no cancerosas no son capaces, como se demostrará de manera más detallada a continuación. Así, la determinación de la presencia de ProNGF en la muestra permite concluir en la patología buscada, permitiendo la ausencia de ProNGF concluir en la ausencia de patología. La presencia de ProNGF dentro de los tumores puede también ser mostrada *in vivo*, *in situ* en los tumores.

10 Para mostrar la presencia de ProNGF dentro de un tumor *in vivo*, se pueden utilizar cualquier método de imagenología conocido por el experto en la materia. Para ello, se puede acoplar una pareja de unión del ProNGF a un trazador de imagenología. Las parejas de unión específicas del ProNGF son cualquier pareja susceptible de unirse al ProNGF. A título de ejemplo, se pueden citar los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos, los receptores y cualquier otra molécula capaz de unirse al ProNGF.

Los anticuerpos parejas de unión son, por ejemplo, bien unos anticuerpos policlonales, o bien unos anticuerpos monoclonales.

20 Por acoplamiento de las parejas de unión a un trazador de imagenología, se entiende la fijación de un trazador capaz de ser detectado mediante cualquier método de imagenología conocido por el experto en la materia, y generar directa o indirectamente una señal detectable. Así, el trazador puede ser un trazador radioactivo como el tecnecio-99. En este caso, el órgano que padece cáncer primitivo o metástasis fijará el ProNGF y su trazador. La radiación emitida por el órgano puede ser filmada por una cámara especial, por ejemplo una gamma-cámara. El aparato recoge los centelleos generados por la sustancia radioactiva y permite así visualizar el órgano.

En otro procedimiento de la invención el trazador comprende un cuerpo radioactivo que emite positrones (Fluor 18). Las imágenes se adquirirán después mediante un sistema de tomografía por emisión de positrones.

30 En otro procedimiento preferido de la invención, la pareja del ProNGF puede ser acoplada a nanopartículas. A título de ejemplo, puede tratarse de nanopartículas supramagnéticas. Por ejemplo unas nanopartículas magnéticas aniónicas para la aplicación al marcado celular directo y la detección *in vivo* por imagenología por resonancia magnética nuclear. Puede tratarse asimismo de nanopartículas de oro. Gracias a los procedimientos de la invención que permiten la detección del ProNGF *in vivo*, se podrán visualizar las zonas del organismo en las que hubo fijación de la pareja de unión del ProNGF, produciendo los cánceres un ProNGF, y en particular los cánceres de mama, de la próstata, de tiroides y de los pulmones, así como las localizaciones de sus metástasis a distancia y los alcances ganglionarios.

La determinación de la presencia de ProNGF *in vitro* se puede realizar por detección directa del ProNGF, por cultivo de células sensibles al ProNGF, o cualquier otro procedimiento de determinación de la presencia de una proteína en una muestra, conocido por el experto en la materia.

40 La determinación de la presencia de ProNGF por detección directa de dicho ProNGF constituye un modo de realización particular de la invención.

Por detección directa de ProNGF, se entiende la puesta en evidencia del propio ProNGF en la muestra biológica.

La detección directa del ProNGF en la muestra biológica puede ser realizada mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, como por ejemplo por ensayo inmunológico o por espectrometría de masa, lo que constituye un modo de realización particular de la invención.

45 El ensayo inmunológico puede ser cualquier ensayo ampliamente conocido por el experto en la materia que implica unas reacciones inmunológicas, a saber unas reacciones entre el ProNGF y una pareja de unión específica del ProNGF.

50 Las parejas de unión específicas del ProNGF son cualquier pareja susceptible de unirse al ProNGF. A título de ejemplo, se pueden citar los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos, los receptores y cualquier otra molécula capaz de unirse al ProNGF.

Los anticuerpos parejas de unión son, por ejemplo, bien unos anticuerpos policlonales, o bien unos anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales pueden ser obtenidos por inmunización de un animal con ProNGF, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y

separación de dichos anticuerpos de los otros constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, en particular el ProNGF. Los anticuerpos monoclonales pueden ser obtenidos mediante la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.

- 5 En una primera etapa, se inmuniza un animal, generalmente un ratón, (o unas células en cultivo en el ámbito de inmunizaciones *in vitro*) con ProNGF, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos son después fusionados con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente a ProNGF podrán ser ensayadas por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son después purificados, en particular, según la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.
- 10
- 15 Los anticuerpos monoclonales pueden también ser unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

Unos ejemplos de anticuerpos anti-ProNGF son conocidos y están disponibles, en particular, en el catálogo de Chemicon.

- 20 Las parejas de unión específicas del ProNGF podrán ser marcadas para la revelación de la unión ProNGF/pareja de unión cuando la pareja de unión se utiliza como reactivo de detección, y por lo tanto para la detección directa del ProNGF en la muestra biológica.

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

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

- 30 También pueden ser utilizados unos sistemas indirectos, como por ejemplo unos ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Las parejas ligando/anti-ligando son bien conocidas por el experto en la materia, lo que es el caso por ejemplo de las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido. En este caso, es el ligando el que lleva la pareja 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.

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

- 40 Según el tipo de marcado utilizado, el experto en la materia añadirá unos reactivos que permitan la visualización del marcado.

A título de ejemplo de ensayos inmunológicos tales como los definidos anteriormente, se pueden citar los métodos "sándwich" tales como ELISA, IRMA y RIA, los métodos denominados de competición y los métodos de inmunodetección directa como la inmunohistoquímica, la inmunocitoquímica, la transferencia western y la transferencia Dot.

- 45 En el caso de los métodos denominados de competición, el ProNGF está marcado tal como se ha descrito antes para la pareja de unión.

La espectrometría de masas puede también ser utilizada para la detección directa del ProNGF en la muestra biológica. El principio de la espectrometría es ampliamente 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.

- 50 Para ello, la muestra biológica previamente tratada o no se pasa en un espectrómetro de masas y se compara el espectro obtenido con el del ProNGF. Un ejemplo de tratamiento previo de la muestra consiste en hacerlo pasar en un soporte de inmunocaptura, que comprende una de las parejas de unión del ProNGF, por ejemplo un anticuerpo dirigido contra el ProNGF. Otro ejemplo de tratamiento previo de la muestra puede ser el pre-fraccionamiento de la

muestra biológica, a fin de separar entre sí las proteínas de la muestra. En unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia, se pueden agotar por ejemplo en primer lugar las proteínas, mayoritarias de la muestra.

5 La muestra biológica utilizada para la detección directa del ProNGF, susceptible de contener un ProNGF como tal, puede estar constituida por un fluido biológico o un tejido que proviene de la biopsia del tumor o de las metástasis del paciente considerado.

A título de fluido biológico, se puede citar la sangre total o sus derivados tales como el suero o el plasma, la médula ósea, la leche, el líquido cefalorraquídeo, las orinas y los exudados. Se prefiere la sangre o sus derivados.

10 Para la detección del ProNGF, el fluido biológico, que constituye un modo de realización particular de la invención, puede necesitar un tratamiento particular. En efecto, el fluido biológico puede contener el ProNGF como tal, o bien puede contener unas células tumorales circulantes que contienen ProNGF, y/o unas células tumorales circulantes que son capaces de segregar el ProNGF.

Así, según un modo de realización de la invención, el fluido biológico es previamente tratado para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.

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

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

20 En el caso de la sangre o de la médula a título de fluido biológico, las células tumorales circulantes pueden ser aisladas gracias a una técnica de separación celular sobre Ficoll asociada a una depleción de las células sanguíneas que utiliza unos anticuerpos anti-CD45 acoplados a bolas magnéticas (Dynal Biotech ASA, Noruega).

25 La detección directa del ProNGF puede entonces ser efectuada directamente a partir de células tumorales circulantes aisladas del fluido biológico, por ejemplo por marcado inmunocitoquímico de estas células con un anticuerpo anti-ProNGF, después de haber depositado las células tumorales sobre una lámina con citospina. La detección directa del ProNGF puede también ser efectuada directamente en las células tumorales circulantes utilizando el método de citometría de flujo tal como se describe en Métézau P, Ronot X, Le Noan-Merdrignac G, Ratinaud MH, "La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique" (Tomo I), Ed. Medsi-MacGrawhill.

30 En estas condiciones, dichas células circulantes pueden ser tratadas en condiciones que permiten el bloqueo del ProNGF en el interior de dichas células. Tal tratamiento está descrito, por ejemplo, en Intracellular Flow Cytometry, Applied reagents and Techniques, p. 1-21, BD Pharingen.

La detección del ProNGF se lleva a cabo entonces después de haber hecho permeable la membrana de las células para hacer entrar las parejas de unión específica del ProNGF.

35 La detección directa del ProNGF a partir de las células circulantes puede también ser efectuada con la ayuda del procedimiento descrito en la solicitud de patente WO 03/076942 depositada por una de las solicitantes.

La detección directa del ProNGF en las células tumorales se puede efectuar también en el medio de cultivo de dichas células después de haberlas cultivado en unas condiciones tales que segregan ProNGF.

40 Estas condiciones de cultivo son unas condiciones clásicas tales como 37°C bajo atmósfera húmeda y al 5% de CO₂.

Cuando la muestra biológica a ensayar es un tejido que proviene de la biopsia del tumor o de las metástasis del paciente, lo que constituye un modo de realización particular de la invención, la detección directa del ProNGF se efectúa directamente sobre los cortes obtenidos, sin tratamiento previo de dicho tejido.

45 Otro modo de detección de la presencia del ProNGF consiste en el cultivo, en presencia de la muestra biológica, de células sensibles al ProNGF, lo que constituye un modo de realización particular de la invención.

En este caso, la detección de la presencia del ProNGF en una muestra biológica se pone en evidencia por la reacción de las células sensibles al ProNGF.

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

50 A título de células sensibles al ProNGF, se pueden citar las células de origen neuronal, tales como, por ejemplo, las células PC12 (Pedraza *et al.* Am. J Pathol. 2005, 166, 533-543).

La muestra biológica que se puede utilizar para la detección de la presencia del ProNGF por cultivo de células sensibles al ProNGF puede ser cualquier muestra tal como la descrita anteriormente.

5 Así, la muestra biológica puede estar constituida de fluido biológico, llegado el caso previamente tratado para aislar las células tumorales circulantes, pudiendo ellas mismas después ser cultivadas en unas condiciones tales que segregan ProNGF, tal como se ha descrito anteriormente.

El procedimiento de la invención se puede utilizar tanto para el diagnóstico precoz, como para la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de recaídas en el ámbito del cáncer y en particular de los cánceres de mama, de tiroides, de pulmón o de la próstata, ya que sólo las células cancerosas producen ProNGF y que esta producción depende del grado del cáncer.

10 Así, otro objeto de la invención consiste en la utilización del procedimiento de la invención en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de recaídas en el ámbito del cáncer, y en particular de los cánceres de mama, de tiroides, de pulmón o de la próstata.

15 Además de un papel de marcador tumoral, el ProNGF puede también tener un papel de diana terapéutica. En efecto, debido a la capacidad de las células cancerosas y en particular de las células del cáncer de mama, de tiroides, de pulmón o de la próstata para producir ProNGF, mientras que las células normales no lo producen, la diseminación a distancia de las células de cáncer de mama, de tiroides, de pulmón o de la próstata y la invasión de las células pueden ser bloqueadas por un inhibidor de ProNGF susceptible de bloquear la actividad del ProNGF.

20 Por otra parte, el ProNGF, solo o en asociación con otras moléculas, puede servir de diana terapéutica para el direccionamiento de herramientas terapéuticas. Las herramientas terapéuticas pueden ser, en este caso, unas nanopartículas activables, unas citotóxicas, o cualquier otra molécula que permita la destrucción de las células cancerosas.

25 Los inhibidores del ProNGF pueden por lo tanto ser utilizados como medicamentos. Así, la presente invención tiene también por objeto la utilización de un inhibidor de ProNGF para la preparación de un medicamento, en particular en el tratamiento del cáncer y más particularmente del cáncer de mama, de tiroides, de pulmón o de próstata; caracterizada por que el inhibidor es un anticuerpo específico del ProNGF, las fracciones de anticuerpo específico del ProNGF, un análogo en forma soluble de un receptor de ProNGF, un siRNA de un receptor de ProNGF, un oligonucleótido anti-sentido de dicho receptor, péptido derivado del ProNGF que ha conservado las propiedades de unión al receptor del ProNGF o un anticuerpo específico dirigido contra el receptor del ProNGF.

30 Dicho medicamento es útil para bloquear la migración celular o la invasión de las células tumorales en los pacientes que padecen cáncer, y más particularmente cáncer de mama, de tiroides, de pulmón o de próstata.

Se entiende por migración celular la diseminación a distancia en los pacientes que padecen cáncer, y más particularmente cáncer de mama, de tiroides, de pulmón o de próstata (metástasis) y se entiende por invasión, la penetración local de las células cancerosas.

35 Generalmente, están incluidas en la invención las composiciones farmacéuticas que comprenden, a título de principio activo, al menos un inhibidor de ProNGF, eventualmente en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas útiles contra el cáncer comprenden, a título de principio activo, al menos un inhibidor de ProNGF susceptible de bloquear la migración celular o la invasión.

40 Por inhibidor de ProNGF, se entienden los inhibidores directos de ProNGF, es decir los inhibidores que bloquean la actividad biológica de la proteína, tales como las parejas de unión de ProNGF, así como los inhibidores de los receptores con ProNGF o cualquier inhibidor de las vías de señalización de ProNGF, así como cualquier molécula que puede unirse específicamente al ProNGF, haya bloqueo o no de la actividad biológica.

Un ejemplo de receptor con ProNGF expresado por las células epiteliales del seno, tanto tumorales como normales, comprende la sortilina.

45 Las parejas de unión del ProNGF específicas apropiadas, a título de principio activo, son en particular tales como se han definido antes en los ensayos inmunológicos, y pueden ser cualquier otra pareja conocida por el experto en la materia capaz de bloquear la migración o invasión celular. Según un modo de realización particular, la pareja específica susceptible de bloquear la migración o invasión de células de cáncer de mama es un anticuerpo anti-ProNGF.

50 Otro ejemplo de inhibidor directo del ProNGF comprende los análogos, en forma soluble, de receptores con ProNGF, tal como los análogos de la sortilina en forma soluble, lo que constituye también un modo de realización de la invención.

Por inhibidor de receptores con ProNGF expresados por las células epiteliales del seno, tanto tumorales como normales, se entienden cualquier molécula que bloquea la actividad del ProNGF, por ejemplo a través de dicho

receptor, o que bloquea su producción. El bloqueo de la actividad del ProNGF a través de dicho receptor se puede realizar impidiendo la unión del ProNGF a dicho receptor, como por ejemplo con la ayuda de un agente capaz de unirse a dicho receptor, que toma así el sitio del ProNGF. Un ejemplo de tal inhibidor comprende un péptido derivado de ProNGF que ha conservado las propiedades de unión a dicho receptor o un anticuerpo dirigido contra el receptor.

5 Se puede asimismo bloquear la actividad del ProNGF bloqueando la producción de dicho receptor con la ayuda de inhibidores del ARNm de dicho receptor o del gen que codifica para dicho receptor. A título de inhibidor del ARNm del receptor, se puede utilizar un fragmento sintético de este ARNm. En efecto, la tecnología del ARN interferente (Small Interference RNA o SiRNA) está basada en la utilización de un oligonucleótido ARN bicatenario que
10 corresponde a una secuencia corta del ARNm celular a inhibir. Este oligonucleótido en dúplex (introducido o no en un plásmido), después de la entrada en la célula, está soportado por el sistema enzimático Dicer/Risc, lo que conllevará la degradación del ARNm celular correspondiente (Dykxhoorn D *et al.*, 2003, Nature Reviews, vol. 4, p457-467). A título de inhibidor del gen que codifica para el receptor, se puede citar un oligonucleótido antisentido de dicho receptor. Este oligonucleótido puede ser fácilmente preparado por el experto en la materia (Lefrançois S *et al.* Biol. Proced. online. 2005, 7(1):17-25.

15 Según un modo de realización particular de la invención, el inhibidor del ProNGF es un SiRNA del receptor con ProNGF.

Por inhibidor de las vías de señalización del ProNGF, se entiende cualquier molécula que bloquea la actividad biológica del ProNGF, tal como su actividad sobre la migración y la invasión celular.

20 Para dirigir la acción terapéutica de los diferentes inhibidores, estos últimos pueden ser puestos en condiciones tales que penetran específicamente en las células de interés, tales como las células tumorales, lo que constituye otro modo de realización de la invención.

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

25 Por ejemplo, en el ámbito del cáncer de mama, la molécula portadora puede ser un anticuerpo anti-MUC1 o un anticuerpo anti-célula epitelial, o también un anticuerpo anti-HER-2/neu. En el ámbito del cáncer de tiroides, la molécula portadora puede ser un anticuerpo anti-tiroglobulina o un anticuerpo anticélula epitelial. En el cáncer de la próstata, la molécula portadora puede ser un anticuerpo anti PSA o un anticuerpo anticélula epitelial. En el ámbito del cáncer de pulmón, la molécula portadora puede ser un anticuerpo anticélula epitelial.

30 Los inhibidores de las vías de señalización del ProNGF pueden también ser fijados a unos agentes anticancerosos. Por agente anticanceroso, se entiende cualquier compuesto que será tóxico para la célula cancerosa. Por ejemplo las parejas del ProNGF pueden estar asociadas a unas nanopartículas terapéuticas, que podrán permitir la destrucción dirigida del tumor cuando se activen. En otro procedimiento de la invención, la pareja del ProNGF puede estar acoplada a un agente citotóxico, o a una molécula que bloquea un proceso de carcinogénesis.

35 Preferentemente, cuando la composición farmacéutica comprende, a título de principio activo, un inhibidor de ProNGF tal como un inhibidor directo o un inhibidor de las vías de señalización del ProNGF, estos últimos son puestos en condiciones tales que penetran específicamente en las células tumorales de interés, teniendo los inhibidores del ARNm del ProNGF y los inhibidores del gen que codifica para el NGF la capacidad de penetrar naturalmente en dichas células.

40 La cantidad y la naturaleza del excipiente pueden ser fácilmente determinadas por el experto en la materia. Se seleccionan según la forma farmacéutica y el modo de administración deseados.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son convenientes para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica, rectal, intraocular, intra-auricular, pudiendo dicho principio activo ser administrado en forma unitaria de administración.

45 Las formas unitarias de administración puede ser, por ejemplo unos comprimidos, unas cápsulas duras, unos gránulos, unos polvos, unas soluciones o suspensiones orales inyectables, unos parches transdérmicos ("parches"), unas formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraocular, intranasal, intra-auricular, por inhalación, unas formas de administración tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intratumoral o intravenosa, unas formas de administración rectal o unos implantes. Para la administración tópica, se pueden considerar unas cremas,
50 geles, pomadas, lociones o colirios.

Estas formas galénicas son preparadas según los métodos habituales de los campos considerados.

Dichas formas unitarias son dosificadas para permitir una administración diaria de 0,001 a 10 mg de principio activo por kg de peso corporal, según la forma galénica.

Puede haber casos particulares en los que son apropiadas unas dosificaciones más elevadas o más bajas; tales dosificaciones no se salen del ámbito de la invención. Según la práctica habitual, la dosificación apropiada a cada paciente se determina por el médico según el modo de administración, el peso y la respuesta del paciente.

5 La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes, dados a título ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las tablas 1 a 2, y de las figuras 1 a 10 anexas, en las que:

- la figura 1 representa una fotografía de transferencia western, que muestra la producción de ProNGF por las células epiteliales mamarias cancerosas (MCF-7, T47-D, BT-20 y MDA-MB-231), pero no por unas células normales (células CEMN), siendo la actina utilizada a título de control positivo,

10 - la figura 2 representa una fotografía de transferencia western, que muestra la presencia de ProNGF en las biopsias mamarias cancerosas (ST-1 a -4) pero no en las biopsias normales (SS-1 a -4), siendo la actina utilizada a título de control de normalización,

- la figura 3 representa una fotografía de transferencia western que muestra:

* figura 3A: la secreción del ProNGF por las células cancerosas MCF-7 (pista del medio condicionado y concentrado), siendo las 2 pistas de la derecha unas pistas control,

15 * figura 3B: que la unidad de concentración/desalado utilizada para el experimento de la figura 3A era capaz de retener el NGF,

- la figura 4 representa una fotografía de transferencia western que muestra la presencia de ProNGF en los sueros de ratones inyectados con unas células cancerosas y su ausencia en los sueros de ratones normales,

20 - la figura 5 representa unos gráficos de detección por espectrometría de masas de ProNGF en el medio condicionado por los MCF-7 (figuras 5A, 5C y 5E) o de ProNGF recombinante (figuras 5B y 5D), que da la abundancia relativa en función de la masa,

- la figura 6 representa una fotografía de transferencia western que muestra la presencia de sortilina en las células epiteliales mamarias cancerosas MCF-7, T47-D, BT-20 y MDA-MB-231) y las células normales (células CEMN), siendo la actina utilizada a título de control positivo,

25 - la figura 7 representa un gráfico que da el número de células MDA que crece en el medio de cultivo EMEM al final de 24, 48 y 96 horas de cultivo, transfectadas bien con un medio de cultivo sólo (Mock), o bien con un ARN interferente control negativo (siGFP, molécula de ARN bicatenario, compuesta de las secuencias parcialmente complementarias SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2, en las que el nucleótido N representa la timina T), o bien con un ARN interferente que disminuye la expresión de la sortilina (siSORT, molécula de ARN bicatenario, compuesta de las secuencias parcialmente complementarias SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4, en las que la base n representa la timina T),

Secuencia siGFP:	SEC ID nº 1	5'-GCUGACCCUGAAGUUCAUCNN-3'
	SEC ID nº 2	5'-GAUGAACUUCAGGGUCAGCNN-3'
Secuencia siSORT:	SEC ID nº 3	5'-GGUGGUGUUAACAGCAGAGNN-3'
	SEC ID nº 4	5'-CUCUGCUGUUAACACCACCNN-3'

35 - la figura 8 representa un gráfico que da el porcentaje de migración celular a partir de células MCF-7 que se bañan bien en un medio de abstinencia sólo, o bien en un medio de abstinencia complementado con 200 ng/ml de ProNGF, o bien en un medio de abstinencia complementado con 200 ng/ml de ProNGF y 20 µm de galardina, o bien en un medio de abstinencia complementado con 20 µm de galardina, o bien en un medio de abstinencia complementado con 200 ng/ml de NGF, y

40 - la figura 9 representa un gráfico que da el índice de invasión a partir de células MCF-7 que se bañan bien en un medio de abstinencia sólo, o bien en un medio de abstinencia complementado con 200 ng/ml de ProNGF, o bien en un medio de abstinencia complementado con 200 ng/ml de ProNGF y 20 µm de galardina, o bien en un medio de abstinencia complementado con 20 µm de galardina, o bien en un medio de abstinencia complementado con 200 ng/ml de NGF.

45 - la figura 10, trazada a partir de fotografías de transferencia western, muestra la disminución de la expresión del ProNGF en las células MCF-7 tras la transfección de un ARN interferente ProNGF (siProNGF), al final de 24 o de 48 horas de cultivo. La actina se utilizó como control positivo para validar la equicarga. Las células MCF-7 se transfectaron por unos ARN interferentes (siRNA) dirigidos bien contra la GFP (siGFP, compuesto de secuencias parcialmente complementarias SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2), o bien contra ProNGF (siProNGF, molécula de ARN bicatenario, compuesta de las secuencias parcialmente complementarias SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6, en las que la base N representa la timina T). La cantidad relativa de ProNGF detectada en transferencia se evaluó con el

programa QuantityOne (Bio-Rad) detallada en la equicarga y presentada en forma de histograma en el que el 100% está atribuido a la condición de control siGFP,

Secuencia siGFF:	SEC ID nº 1	5'-GCUGACCCUGAAGUUCAUCNN-3'
	SEC ID nº 2	5'-GAUGAACUUCAGGGUCAGCNN-3'
Secuencia siProNGF:	SEC ID nº 5	5'-CAGUGUAUUCAAACAGUAUNN-3'
	SEC ID nº 6	5'-GUACUGUUUGAAUACACUGNN-3'

Ejemplo 1: Cultivo de las células

5 1.1. Material

Las células utilizadas son unas líneas establecidas de células de cáncer de mama (BT-20, MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection) y unas CEMN (Células epiteliales mamarias normales) en primocultivo obtenidas de pacientes que han sufrido una mamoplastia en el "Centre Oscar Lambret de Lille". Las MCF-7, las MDA-MB-231 y las T-47D son unas células epiteliales que provienen de efusiones pleurales en pacientes que padecen adenocarcinoma; las BT-20, por su parte, provienen de un carcinoma primario. MCF-7 y T-47D son denominadas «hormono-sensibles» ya que expresan unos receptores con estrógenos, mientras que las BT-20 y las MDA-MB-231 son denominadas «hormono-insensibles» ya que no expresan ninguno.

Las biopsias provienen de pacientes que han sufrido una mamoplastia de tejido no maligno (Professeur Pellerin CHRU, Lille) o una exéresis de tejidos cancerosos (Doctor Laurent, Croisé Laroche, Marcq en Baroeul).

Las láminas de inmunohistoquímica (tissue array) que contienen unas manchas de tejidos tumorales y sanos mamarios provienen de Biochain Inc. (Cat. nº T8235731). Otras láminas que contienen inmunohistoquímica que contienen unos tejidos procedentes de diversos órganos (tejidos cancerosos y tejido sano correspondiente) provienen de Superbio Chips (Cat. No. MA (tissu cancer), MAN (tejido sano correspondiente) y AA (órganos sanos diversos)). Se obtuvieron de Iffa Credo (Francia) unos ratones hembras SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) de 6 semanas y aclimatados durante al menos 2 semanas. Estos ratones se criaron a 20-22°C manteniendo una alternancia día/noche de 12 h (luz de 6H00 a 18H00) y alimentados *ad libitum* siguiendo de las directivas fijadas por la "Institutional Animal Care".

El ProNGF utilizado es un recombinante humano comercializado por SCIL proteins (Alemania). El EGF, el HGF y el NGF recombinante se obtuvieron de R&D systems (Francia). El cortisol, la insulina, el DMSO (DiMethyl Sulfoxide), la toxina colérica, la transferina, el análogo de la ceramida C2 (N-acetil-D-esfingosina), el Hoechst 33258 (BisBenzimide), se obtuvieron de Sigma (Francia). EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), tripsina-EDTA (Etileno-Diamina-Tetra-Acetato), HEPES (ácido N-2-Hidroxi-Etil-Piperazina-N'-2'-Etano-Sulfónico), L-glutamina, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomina, gentamicina son comercializados por Cambrex (Francia). El SVF (Suero de Ternera Fetal) está comercializado por Gibco Invitrogen Corporation (Francia). Los diferentes plásticos utilizados: criotubos de 1 ml, tubos a centrifugar de 15 y 50 ml, cajas Petri de 100 mm de diámetro, cajas de 75 cm², cajas de 175 cm² y placas de 6 pocillos (pocillos de 35 mm de diámetro) son comercializados por Starstedt (Alemania). Los transwell[®] son obtenidos de Costar (Francia). La fibronectina se obtiene de Becton Dickinson (Francia). El glicergel está comercializado por Dako (Francia). La galardina se obtiene de Tebu-Bio (Francia). El colágeno de tipo I está vendido por Upstate (Estados Unidos de América).

1.2. Descongelación y mantenimiento de las células

Los criotubos de células son sacados del nitrógeno líquido y descongelados durante 2 minutos a 37°C. La suspensión se recupera después y se transfiere en un tubo de centrifugar de 50 ml que contiene 19 ml de MEM (Minimum Essential Medium). El conjunto se centrifuga a 200 g (15 minutos) para quitar las trazas de DMSO (DiMethyl Sulfoxide). El residuo celular se recupera y después se recoge con 10 ml de medio completo (composición siguiente) y se transfiere en una caja de 75 cm². El medio se cambia cada 24 horas, y 24 horas más tarde se pasan las células. Las células son después mantenidas durante 2 semanas antes de cualquier experimento.

Las líneas cancerosas son mantenidas en unas cajas de 75 cm² sobre las cuales adhieren y crecen en monocapa en un medio completo: EMEM suplementado del 10% de SVF, 20 mM de HEPES, 2 g/l de bicarbonato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, 40 u/ml de penicilina/estreptomina y de 50 µg/ml de gentamicina. Las CEMN son mantenidos en unas cajas de 75 cm² sobre las cuales adhieren y crecen en monocapa en un medio completo: DMEM/F12 suplementado del 5% de SVF, 10 u/ml de insulina, 5 µM de cortisol, 2 ng/ml de EGF, 0,01 ng/ml de toxina colérica, 100 µg/ml de penicilina y 45 µg/ml de gentamicina.

Las células son cultivadas en atmósfera húmeda a 37°C y al 5% de CO₂. El medio de mantenimiento se cambia cada 2 días y las células son pasadas a confluencia.

Ejemplo 2: Detección del ProNGF

2.1. Metodología

Lisis de las células y de las biopsias mamarias: extracción proteica

5 Las células son inoculadas en 3 cajas Petri de 100 mm de diámetro, después, al 95% de confluencia, se aclaran las células 2 veces sobre hielo con PBS (Phosphate Buffered Saline): KCl 107 mM, KH₂PO₄ 59 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 56 mM, se lisan con 100 µl/cada de un tampón de lisis que contiene: 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 1% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), y unos inhibidores de actividad proteásica: 1 mM de fenil-metil-sulfonido-fluoruro, 1 mM de ortovanadato, 1 mM de Na₄P₂O₇, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina. Las cajas se congelan durante 12 horas y después se raspan y se reagrupan los lisados, se calientan durante 5 min. a 100°C y se centrifugan a 10 000 g (10 min. a 4°C) y se recupera el sobrenadante.

10 Las biopsias son pesadas y colocadas con 10 veces su volumen de tampón de lisis (anteriormente descrito) sobre rueda (1 hora a 4°C). Después, se trituran, sobre hielo, con Dounce, se congelan (20 minutos a -80°C) y se descongelan sobre hielo. Finalmente, se centrifugan a 13 000 g (10 minutos a 4°C), se elimina una pasta lipídica y se recupera el sobrenadante.

15 Los sobrenadantes son determinados mediante el método con ácido bicinconínico comparado con una gama de seroalbúmina bovina y después alicuotado en 50 µl antes de la congelación.

Obtención de medio acondicionado y de suero

20 Las MCF-7 son inoculadas en un medio completo en unas cajas de 175 cm². Al 90% de confluencia, estas cajas se aclaran 2 veces en un medio de abstinencia y después las células se someten a abstinencia durante 24 horas con 14 ml de medio de abstinencia. Después de este tiempo, el medio acondicionado por las células se recupera y se centrifuga a 1000 g (15 minutos a 4°C). El sobrenadante se utiliza directamente después o se congela a -20°C. Se cargan unas unidades de concentración/desalado con un límite de corte de 10 kDa (Centricon Plus 20 Millipore, Francia), cada una con 14 ml de medio acondicionado por las MCF-7 y después se centrifugan a 4000 g (15 minutos a 4°C). Estas mismas unidades se recargan nuevamente 3 veces con 14 ml de medio acondicionado (lo que lleva a una concentración de un factor 4 del medio de partida). Después, las unidades son desaladas con agua de calidad mQ (18,2 osm) por carga de 14 ml y centrifugación a 4000 g (15 minutos a 4°C), esto 2 veces según las recomendaciones del fabricante. Finalmente, el concentrado se recupera por inversión de la unidad y centrifugación a 1000 g (4 minutos a 4°C); se recuperan 250 µl. El medio acondicionado concentrado se alicuota después de 50 µl y se congela a -20°C. Se obtiene entonces un factor de concentración de 4x14 000/250, es decir 224 veces.

30 Las MDA-MB-231 (3x10⁶) se resuspenden en PBS y después se inyectan de manera subcutánea en los costados de los ratones SCID de 8 semanas de edad. El volumen del tumor se mide después de dos semanas cada dos días. Después de 7 semanas, los ratones son anestesiados con éter, y después se extrae la sangre mediante extracción intracardiaca, antes de sacrificar a los animales. La sangre se deja una noche a 4°C para permitir la coagulación, siendo el suero recuperado después de la centrifugación, ensayado y congelado a -204°C.

35 SDS-PAGE

40 Las alícuotas (50 µl) se descongelan antes de la utilización, se recogen con 12,5 µl de tampón Laëmmli 5x: 5% SDS, 5% β-mercapto-etanol, 50% glicerol, 50 mM Tris pH 6,8, 0,3% azul de bromofenol. Las proteínas son depositadas en los pocillos de un gel de poliacrilamida del 12,5%. Después de la migración (bajo 30 mA, durante 5 horas) y de la transferencia sobre membrana de nitrocelulosa (bajo 200 mA, durante 1 hora), se aprecia la calidad de la transferencia mediante una coloración con rojo de Ponceau.

Inmunodetección

45 Las membranas se saturan mediante seroalbúmina bovina al 4% en una solución de TBS (Tris Buffered Saline) 0,1% Tween20 (17.54 g NaCl, 2.42 g Tris, 2 ml tween20, QSP 2 L, pH ajustado a 7,4) a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la saturación, las membranas son incubadas durante la noche a 4°C con diferentes anticuerpos primarios: anti-ProNGF (AB9040 de Chemicon) al 1:2000, anti-NGF (SC-548 de Sigma) al 1:2000 o anti-Actina (A-2066 de Sigma) al 1:5000 en la solución de saturación. Después del aclarado con TBS 0,1% Tween20, las membranas son incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario al 1:20.000, anti-conejo (A-1949 de Sigma, Francia) en la solución de saturación, acoplado a una peroxidasa de rábano picante. Después del aclarado, se realiza la revelación con el sistema ECL (Pierce Interchim, Francia) según los datos de utilización recomendados.

50

Inmunohistoquímica

En una primera etapa, las láminas de tejido array se desparafinan. Para ello, se incuban sucesivamente en los baños siguientes durante 10 minutos: metilciclohexano (2 veces), etanol al 100%, etanol al 95%, etanol al 70% y agua. Las láminas son después aclaradas con TBS 0,1% Tween 20 (TBS-T), durante 10 min., bajo agitación. Los

antígenos son reactivados en el tampón citrato 10 mM pH6, calentando hasta 90°C durante 40 min., y después dejando enfriar hasta temperatura ambiente durante 30 min. Las peroxidasas endógenas son inhibidas por incubación en TBS-T que contiene 3% de H₂O₂, durante 5 min. Las láminas son después saturadas por 3% de BSA en TBS-T, durante 1h a 37°C, en cámara húmeda. Después, se incuban las láminas durante 2h con el anticuerpo primario anti-ProNGF (AB9040 de Chemicon) diluido al 1/200 en TBS-T que contiene 3% de BSA (incubación a 37°C en cámara húmeda). Después de 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, se incuban las láminas durante 2h a 37°C en cámara húmeda con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa de rábano picante (Cat. nº 711-035-152 Jackson ImmunoResearch) diluido al 1/400 en la solución de saturación. Las láminas son lavadas 3 veces durante 10 minutos en TBS-T, después de nuevo 3 veces durante 10 minutos en PBS. La revelación se realiza con el sustrato Sigma Fast (Cat. nº D-4168, Sigma-Aldrich) durante 5 min. La coloración se detiene mediante lavado en PBS. Se efectúa una contra-coloración con hematoxilina de Harris (Cat. nº MHS16, Sigma-Aldrich) durante 30 s. Después de los lavados con agua y con PBS, las láminas son montadas para observación con microscopio.

Espectrometría de masas (MS)

El medio acondicionado por las MCF-7 se inyecta en una nanocolumna LC (Liquid Chromatography) C4 (Dionex, Francia) que permite separar las proteínas enteras en función de un gradiente de hidrofobicidad creciente. Así, las proteínas más hidrófobas son eluidas en último lugar. Una vez separadas, las proteínas enteras son ionizadas por nanoESI (ElectroSpray Ionization), y después analizadas en una trampa iónica (Station LCQ Deca XP⁺™ de Thermo Electron) en función de su masa (m) y de su carga (z). Se utilizó la técnica del SIM (Selected Ion Monitoring) escáner que permite escanear únicamente ciertos iones de interés. Estos iones multicargados, característicos del ProNGF recombinante, se determinaron previamente en nanoLC-nanoESI/SM. Una vez detectados en el medio acondicionado con la ayuda del SIM del ProNGF, el espectro de masas multicargado correspondiente se deconvoluciona para encontrar la masa de la proteína que generó este espectro.

2.2. Resultados

Detección a partir de las células epiteliales

Se depositan 50 µg de extractos proteicos totales de células epiteliales mamarias sobre un gel para una SDS-PAGE. Después de la transferencia sobre membrana de nitrocelulosa, se realiza una inmunodetección con el anticuerpo AB9040 y el anticuerpo A-2066 (control de equicarga). CEMN: células epiteliales mamarias normales, BT-20, MCF-7, MDA-MB-231, T-47D son unas líneas de células epiteliales mamarias cancerosas.

Los resultados son indicados en la figura 1, que representa una fotografía de transferencia western que muestra la producción de ProNGF por las células epiteliales mamarias cancerosas (MCF-7, T47-D, BT-20 y MDA-MB-231) pero no de células normales (células CEMN), siendo la actina utilizada como control positivo.

Detección a partir de biopsias mamarias por transferencia western

Se depositan 50 µg de extractos proteicos de biopsias sobre un gel para una SDS-PAGE. Después de la transferencia sobre membrana de nitrocelulosa, se realiza una inmunodetección con el anticuerpo AB9040 y el anticuerpo A-2066 (control de equicarga). SS-x: biopsia de seno tumoral número x, ST-x: biopsia de seno tumoral número x.

Los resultados son indicados en la figura 2, que representa una fotografía de transferencia western, la presencia de ProNGF en las biopsias mamarias cancerosas (ST-1 a -4) pero no las biopsias normales (SS-1 a -4), siendo la actina utilizada como control positivo.

Detección a partir de biopsias mamarias por inmunohistoquímica

Se utilizaron unas láminas de tejido array para cribar un gran número de extracciones. Se trata de biopsias mamarias expuestas sobre láminas. Los ejidos arrays utilizados aquí contienen 60 exposiciones de biopsias que corresponden a 1 control, 4 donantes sanos y 25 pacientes que padecen cáncer de mama, en duplicado. Las características de los pacientes así como la intensidad del inmunomarcado por el anticuerpo anti-ProNGF se resumen en la tabla 1. En las biopsias mamarias procedentes de donantes sanos, está presente un marcado débil (intensidad + en 4/4 pacientes), mientras que la señal es mucho más fuerte en los tejidos mamarios cancerosos (intensidad ++/+++ en 20/25 pacientes). Además, el perfil de marcado es diferente entre los dos tipos de tejidos: en el tejido canceroso, el marcado es esencialmente epitelial mientras que en las biopsias sanas, no lo es.

Tabla 1. Características de las biopsias mamarias presentes en el tejido array de cáncer de mama e intensidad del marcado inmunohistoquímico por el anticuerpo anti-ProNGF.

Identificador	Diagnóstico	Nivel de diferenciación	Clasificación TNM	Fase	Intensidad del marcado
HT00031	Control				0

HT00500	Seno normal					+
HT00501	Seno normal					+ (sin epitelio)
HT00502	Seno normal					+ (sin epitelio)
HT00503	Seno normal					+ (sin epitelio)
HT00509	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		0
HT00510	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		++
HT00511	Carcinoma lobular invasivo	Fuerte	T2N11M0	IIIB		++
HT00512	Carcinoma lobular invasivo	Fuerte	T2N17M1	IV		+++
HT00513	Carcinoma lobular invasivo	Medio	T2N1M0	IIB		+
HT00520	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N1M0	IIB		0
HT00521	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		++
HT00522	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N1M1	IV		+++
HT00523	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N3M1	IV		++
HT00524	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N4M1	IV		+
HT00531	Fibroadenoma	Desconocido	T2N0M0	IIB		0
HT00532	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N2M0	IIIA		++
HT00533	Carcinoma ductal invasivo	Bajo	T2N0M0	IIB		+++
HT00534	Carcinoma ductal invasivo	Bajo	T2N1M0	IIB		++
HT00535	Carcinoma ductal invasivo	Medio-Bajo	T2N1M0	IIB		+++
HT00542	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		0
HT00543	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		+++
HT00544	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		+++
HT00545	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		+++
HT00546	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		+++
HT00553	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N3M0	IIIB		0
HT00554	Carcinoma ductal invasivo	Bajo	T2N1M0	IIB		+++
HT00555	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		+++
HT00556	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		+++
HT00557	Carcinoma ductal invasivo	Medio	T2N0M0	IIB		+++

Detección a partir de biopsias pulmonares y de tiroides por inmunohistoquímica

5 Se utilizaron otras láminas de tejido array para analizar la expresión del ProNGF en otros tipos de cánceres distintos del cáncer de mama. Se han cribado 9 pacientes para cada cáncer y analizado en paralelo el tejido tumoral y el tejido sano extraído en el mismo paciente cerca del tumor. Así, se pudo poner en evidencia una sobreexpresión del ProNGF en el caso de cáncer de pulmón y de tiroides. Las características de los pacientes, así como la intensidad del inmunomarcado por el anticuerpo anti-ProNGF se resumen en la tabla 2. Para el cáncer de pulmón como de tiroides, el marcado es mucho más fuerte en el tejido tumoral que el tejido sano en 7 pacientes de 9. Para los otros pacientes (2/9 para cada cáncer), las señales tienen la misma intensidad en los tejidos tumorales y sanos. Se recuerda que nuestra técnica de análisis es sólo semi-cuantitativa y que no puede poner en evidencia bajas diferencias de expresión.

10

Tabla 2. Características de las biopsias pulmonares y de tiroides presentes en el tejido array e intensidad del marcado inmunohistoquímico por el anticuerpo anti-ProNGF.

Identificador	Diagnóstico	Nivel de diferenciación	Clasificación TNM	Fase	Intensidad del marcado	
					Tejido canceroso	Tejido Normal
Cáncer de pulmón						
P1	Adenocarcinoma	Fuerte	T2N0M0	IB	+++	++
P2	Carcinoma de grandes células		T2N0M0	IB	+++	++
P3	Cáncer epidermoide	Medio	T2N0M0	IB	+ / ++	++
P4	Cáncer epidermoide	Medio	T2N1M0	IIB	++	++
P5	Cáncer epidermoide	Medio	T4N0M0	IIIB	++	+
P6	Adenocarcinoma	Fuerte	T2N0M0	IB	++	+
P7	Cáncer epidermoide	Medio	T2N1M0	IIB	+++	+
P8	Cáncer epidermoide	Medio	T3N2M0	IIIA	+++	+
P9	Cáncer epidermoide	Fuerte	T2N1M0	IIB	+++	+
Cáncer de tiroides						
T1	Carcinoma papilar		T2N0M0	I	++	+
T2	Carcinoma papilar		T2N0M0	I	++	++
T3	Carcinoma papilar		T2N0M0	I	+++	+++
T4	Carcinoma papilar		T2N0M0	II	+++	+ / ++
T5	Carcinoma papilar		T2N0M0	II	++ / +++	+
T6	Carcinoma papilar		T3N1aM0	III	+++	+
T7	Carcinoma papilar		T1N0M0	I	+++	+
T8	Carcinoma papilar		T2N1bM0	IVA	++ / +++	+
T9	Carcinoma papilar		T3N0M0	III	++ / +++	+

Secreción del ProNGF

5 A fin de determinar si el ProNGF es segregado, se concentró el medio acondicionado por unas MCF-7. Para ello, se someten 100 µl de medio acondicionado concentrado 224 veces, después de electroforesis y transferencia, a una inmunodetección con el anticuerpo SC-548. En control, se analizaron el NGF y el ProNGF recombinantes.

10 Los resultados son indicados en la figura 3A, que representa una fotografía de transferencia western que muestra la secreción del PRoNGF por las células cancerosas MCF-7 y la ausencia de secreción de NGF (pista del medio acondicionado concentrado), siendo las 2 pistas de la derecha unas pistas control. Se puede señalar que no se observa aquí ninguna secreción de NGF ya que el experimento se detiene demasiado pronto para observar un NGF debido a la abundancia de ProNGF. Prosiguiendo el experimento, se observa también una banda para el NGF. Esto demuestra que no sólo el ProNGF es un marcador tumoral, sino que también es segregado en gran cantidad.

15 Para verificar que la unidad de concentración/desalado utilizada, con un límite de corte de 10 kDa, era capaz de retener el NGF (13,6 kDa), se concentró una mezcla de ProNGF y de NGF recombinantes en las mismas condiciones experimentales: se añadieron 20 ng de ProNGF y 20 ng de NGF a un medio no acondicionado y que después han sufrido las mismas condiciones que el medio acondicionado.

Los resultados (Fig. 3B) demuestran que la unidad de concentración/desalado es capaz de retener el NGF y el PRoNGF.

Detección en el suero

Se depositan 100 µg de extractos proteicos de sueros de ratones sobre un gel para una SDS-PAGE. Después de la transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa, se realiza una inmunodetección con el anticuerpo AB9040. En control de equicarga, una banda visible de 24 kDa sobre la membrana después de la coloración con Ponceau está presente. Cancerosos: 6 sueros de ratones inyectados con MDA-MB-231, Sanos: 2 sueros de ratones inyectados con PBS.

Los resultados son indicados en la figura 4 que muestra que una banda inmunorreactiva para el ProNGF aparece a 26 kDa (peso de ProNGF) en 5 sueros de ratones inyectados con unas células cancerosas de 6; y no se detectó ninguna banda en los sueros de los animales control.

Detección por espectrometría de masas

Se procedió como indicado antes. Los resultados son indicados en la figura 5 que representa unos gráficos de detección por espectrometría de masas de ProNGF en el medio acondicionado por las MCF-7 (figuras 5A, 5C y 5E) o de ProNGF recombinante (figuras 5B y 5D), dando la abundancia relativa en función de la masa. Las figuras 5A y B corresponden a la fracción proteica de la nanoLC que responde al SIM de al menos uno de los tres iones característicos del ProNGF. La figura 5C corresponde al espectro de masas de la proteína eluida a 29,43 min. en A. La figura 5D corresponde al espectro de masa del ProNGF recombinante con sus 3 iones característicos en rojo. Finalmente, la figura 5E muestra la deconvolución del espectro de masas de la proteína eluida a 29,43 min. en A.

Estos resultados muestran que aparece en el medio acondicionado por las MCF-7 una proteína que responde a SIM (Selected Ion Monitoring) del ProNGF, que está eluido al mismo tiempo (29,43 min., Fig. 5A) que el ProNGF recombinante (30,17 min., Fig. 5B). Esta proteína, una vez ionizada, genera los mismos iones multicargados (998,2, 1039,9, 1083,4, Fig. 5C) que el ProNGF recombinante (996,2, 1037,5, 1082,6, Fig. 5D). Además, el cálculo por deconvolución de la masa de la proteína da un valor de 25 971 Da (Fig. 5E). Así, estos resultados muestran que, por un lado, se ha identificado el ProNGF en el medio acondicionado por las MCF-7, y que, por otro lado, la detección de ProNGF por espectrometría de masa es posible.

Ejemplo 3: El ProNGF como diana terapéutica

3.1. Metodología

Expresión de la sortilina, receptor del ProNGF

Los métodos de realización de la extracción de las proteínas son idénticos a los descritos para el ProNGF (véase el punto 2.1 anterior).

Para la transferencia western, las membranas son saturadas por la seroalbúmina bovina al 4% en una solución de TBS (Tris Buffered Saline) 0,1% Tween20 (17,54 g NaCl, 2,42 g Tris, 2 ml tween20, CSP 2 l, pH ajustado a 7,4) a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la saturación, las membranas son incubadas durante la noche a 4°C con diferentes anticuerpos primarios: anti-sortilina (BD612101 de BD Biosciences) al 1:2000, anti-Actina (A-2066 de Sigma) al 1:5000 en la solución de saturación. Después del aclarado con TBS 0,1% Tween20, las membranas son incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario al 1:20000 anti-conejo (A-1949 de Sigma, Francia), en la solución de saturación, acoplado a una peroxidasa de rábano picante. Después de este aclarado, la revelación se realiza con el sistema ECL (Pierce Interchim, Francia) según los datos de utilización recomendados.

Transfección de ARN interferente (siRNA)

Los experimentos de transfección de ARN interferente (siRNA) se realizaron con el kit Cell Line Nucleofector de Amaxa y el aparato de electroporación correspondiente. Este sistema permite tener una gran eficacia de transferencia de gen hacia el núcleo (nucleofección).

Las células MDA-MB-231 se pasan 2 días antes de la transfección, para alcanzar el 80% de confluencia en el momento del experimento. Las células a transfectar son tripsinadas y después contadas. El residuo celular (1 millón de células) se recoge en 100 µl de solución Nucleofector Kit V y se añaden 3 µg de siRNA. Esta suspensión celular se transfiere en una cuba de electroporación, dispuesta en el aparato Amaxa y electroporada según el programa X-13. Las células se recultivan después en un pocillo de placa de 6 pocillos durante 24-72h. La proliferación de las células se sigue a lo largo del tiempo y se cuentan a intervalos de tiempo regulares. Una transferencia western anti-sortilina se realiza sobre los lisados recuperados a diferentes tiempos, según el protocolo descrito en el párrafo anterior, «Expresión de la sortilina».

Las células MCF-7 se pasan 3-4 días antes de la transfección, para alcanzar el 50% de confluencia en el momento del experimento. Se recogen dos millones de células en 100 µl de solución Nucleofector Kit V y se añaden 3 µg de siRNA. El programa de transfección utilizado sobre el Nucleofector es E-14. Se realiza una transferencia western anti-ProNGF sobre los lisados recuperados después de 24 horas o después de 48 horas según el protocolo descrito en el punto 2.1. La cantidad relativa de ProNGF detectada en transferencia se evalúa con el programa QuanyOne

(Bio-Rad) detallada en la equicarga (actina) y presentada en forma de histograma en el que el 100% está atribuido a la condición control siGFP.

Mediciones de actividades biológicas de ProNGF

5 Se utilizó un medio denominado de "abstinencia" que designa un medio idéntico al medio completo pero sin suero y suplementado de 2 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina y de 30 $\mu\text{g/ml}$ de transferina. Para las diferentes mediciones de actividades biológicas, se añaden a este medio de abstinencia las diferentes moléculas a ensayar (ProNGF, NGF y galardina). Durante los tratamientos, los medios se cambian cada 24 horas.

Migración e invasión

10 Los ensayos de migración y de invasión son realizados como se ha descrito anteriormente por Bracke *et al.* (1999, J Natl Cancer Inst, 91: 354-359). Los protocolos de utilización de las cámaras de Boyden y de invasión en gel de colágeno se describen a continuación.

Cámara de Boyden (transwell[®])

15 Unas placas de 12 pocillos que contienen unos transwell[®] con un diámetro de poros de 12 μm son equilibradas con un medio de abstinencia y dispuestas a 37°C bajo el 5% de CO₂ durante 2 horas. Después, el medio se aspira y se recoloca en la cámara inferior mediante un medio de abstinencia con las diferentes moléculas a ensayar, mientras que en la cámara superior 40000 células son inoculadas en un medio de abstinencia sólo. Después de 24 horas, los transwell[®] son aclarados con PBS, la cara superior se raspa y después se realiza un marcado con Hoechst (como se describe para el ensayo de supervivencia), a fin de visualizar las células que han atravesado la membrana. Los transwell[®] son montados entre el portaobjeto y la lámina mediante una gota de glisergel calentada a 55°C, después
20 dichas láminas se conservan a 4°C en la oscuridad hasta el recuento. Cada condición se realiza en duplicado, para cada condición, se recuenta un mínimo de 40 campos. Los datos representan la media ponderada por la desviación típica de los recuentos sobre estos 40 campos. Se presentan en porcentaje de migración en el que el 100% de la migración se atribuye a un control HGF a 50 ng/ml.

Ensayo de invasión en gel de colágeno

25 El gel de colágeno de tipo 1 se prepara de la siguiente manera:

Se depositan 2,1 ml de colágeno de tipo 1, 0,8 ml de EMEM (10x), 4,6 ml de PBS, 0,8 ml de NaHCO₃ a 0,25 M, 0,15 ml de NaOH 1 M. 1,25 ml en los pocillos de una placa de 6 pocillos. Una vez solidificado el gel, se inoculan 100000 células con un medio de abstinencia y las diferentes moléculas a ensayar durante 24 horas. Después, las células son contadas y se determina el índice de invasión (número de células en profundidad respecto al número de células en la superficie). Cada condición se realiza en triplicado y se cuentan un mínimo de 45 campos por condición.

30

3.2. Resultados

Expresión de la sortilina, receptor del ProNGF

35 Se depositan 50 μg de extractos proteicos totales de células epiteliales mamarias sobre un gel para una SDS-PAGE. Después de la transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa, se realiza una inmunodetección con el anticuerpo BD612101 y el anticuerpo A-2066 (control de equicarga). CEMN: células epiteliales mamarias normales, BT-20, MCF-7, MDA-MB-231, T-47D son unas líneas de células epiteliales mamarias cancerosas.

40 Los resultados se dan en la figura 6, que representa una fotografía de transferencia western que muestra la presencia de sortilina en las células epiteliales mamarias cancerosas (MCF-7, T47-D, BT-20 y MDA-MB-231) y las células normales (células CEMN), siendo la actina utilizada a título de control positivo. La sortilina aparece por lo tanto en todas las células. Sin embargo, esta banda aparece más intensa en las células cancerosas que en las células normales, mientras que el control de carga, la actina, no varía. Se puede pensar por lo tanto que hay menos sortilina en las células epiteliales mamarias normales que en las cancerosas.

Disminución de la expresión de la sortilina por ARN de interferencia (Sortiline knock down)

45 Las células MDA-MB-231 mantenidas en el medio de cultivo EMEM se transfectaron bien con un medio de cultivo solo (Mock), o bien con un ARN interferente dirigido contra la proteína GFP (siGFP) o con un ARN interferente dirigido contra la sortilina (siSORT).

50 Los resultados presentados en la figura 7 muestran que en las condiciones de cultivo seleccionadas, el número de células MDA-MB-231 en cultivo no aumenta a lo largo del tiempo en presencia de siSORT. En los grupos control Mock o siGFP, el número de células se duplica en 24 y 48 h de cultivo. La proliferación de la línea mamaria cancerosa MDA-MB-231 está por lo tanto ralentizada por transfección de un ARN interferente dirigido contra la sortilina. Se verificó por transferencia western que la transfección del siSORT disminuía bien el nivel de expresión de la proteína sortilina. Así, este experimento nos permitió mostrar que era posible controlar la proliferación anormal de las células del cáncer de mama teniendo como diana la sortilina, el receptor del ProNGF, por un ARN interferente.

Migración

5 Los efectos de ProNGF sobre la migración de las células epiteliales mamarias se han detenido mediante unos ensayos en cámara de Boyden (transwell®). Cada condición se realiza en duplicado y se cuenta un mínimo de 40 campos. Las MCF-7 son inoculadas en un medio de abstinencia en la cara superior del transwell®, mientras que la cara inferior se baña en un medio de abstinencia sólo con o sin 200 ng/ml de ProNGF, o con 20 µM de galardina con o sin 200 ng/ml de ProNGF, o con 200 ng/ml de NGF. Se cuentan después las células que han atravesado el transwell®. * p<0,05, comparación con la condición de abstinencia sola.

10 Los resultados son indicados en la figura 8 que representa un gráfico que da el porcentaje de migración celular a partir de células MCF-7 que se bañan en los diferentes medios. Estos resultados ponen en evidencia que un tratamiento de las células cancerosas MCF-7 por un ProNGF permite aumentar su capacidad para migrar de manera parecida al NGF a dosis iguales. La adición al menos de cultivo de galardina, que es capaz de inhibir la síntesis de NGF a partir de ProNGF, tiende a demostrar que la promoción de la actividad migratoria se debe al ProNGF y no al NGF que es capaz de generar.

Invasión

15 El poder invasivo de las MCF-7 estimuladas por el ProNGF se ensayó en gel de colágeno de tipo I. Cada condición se realiza en triplicado y se cuentan un mínimo de 45 campos por condición. Las MCF-7 son inoculadas sobre un gel de colágeno de tipo I en un medio de abstinencia sólo o con 200 ng/ml de ProNGF, o con 20 µM de galardina, con o sin 200 ng/ml de ProNGF, o con 200 ng/ml de NGF. *p<0,05, comparación con la condición de abstinencia sola.

20 Los resultados se indican en la figura 9, que representa un gráfico que da el índice de invasión a partir de células MCF-7 que se bañan en los diferentes medios. Estos ensayos muestran que el ProNGF estimula la invasión de las MCF-7.

Disminución de la expresión del ProNGF por ARN de interferencia

25 Las células MCF-7 se transfectaron por 3 µg de ARN interferente (siRNA) dirigido bien contra la GFP (siGFP), o bien contra el ProNGF (siProNGF). Al final de 24 a 48h de cultivo, las células se lisan y se realiza una transferencia western. La cantidad relativa de ProNGF detectada en transferencia se evaluó con el programa QuantityOne (Bio-Rad) detallada en la equicarga actina y presentada en forma de histograma en el que el 100% está atribuido a la condición control siGFP (figura 10). En las fotografías de las transferencias, se ha podido observar que la transfección de siProNGF disminuye la expresión de la proteína ProNGF en las células MCF-7. El análisis densitométrico permitió evaluar esta disminución al 59% al final de 24 h de transfección.

30 Este experimento permitió mostrar que era posible disminuir el nivel de expresión de ProNGF en unas células de cáncer de mama utilizando la estrategia del ARN de interferencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux Université des Sciences et Technologies de Lille

35 <120> Procedimiento de ensayo del ProNGF para el diagnóstico *in vitro* del cáncer, en particular del cáncer de mama, de tiroides o de pulmón, y utilización del ProNGF en terapia

<130> ProNGF

<150> FR0600851

<151> 2006-01-31

<160> 6

40 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

45 <220>

<223> siGFP: en la secuencia n representa t (timina)

<220>

- <221> características diversas
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o u
 <400> 1
- 5 gcugaccug aagucaucn n 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> siGFP: en la secuencia n representa t (timina)
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (20)..(21)
- 15 <223> n es a, c, g, o u
 <400> 2
 gaugaacuuc agggucagcn n 21
 <210> 3
 <211> 21
- 20 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> siSORT: en la secuencia n representa t (timidina)
 <220>
- 25 <221> características diversas
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o u
 <400> 3
 ggugguguua acagcagagn n 21
- 30 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
- 35 <223> siSORT: en la secuencia n representa t (timidina)
 <220>
 <221> características diversas

<222> (20)..(21)

<223> n es a, c, g, o u

<400> 4

cucugcuguu aacaccacn n 21

5 <210> 5

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

10 <223> siProNGF: en la secuencia n representa t (timidina)

<220>

<221> características diversas

<222> (20)..(21)

<223> n es a, c, g, o u

15 <400> 5

caguguauuc aaacaguaun n 21

<210> 6

<211> 21

<212> ARN

20 <213> Artificial

<220>

<223> siProNGF: en la secuencia n representa t (timidina)

<220>

<221> características diversas

25 <222> (20)..(21)

<223> n es a, c, g, o u

<400> 6

guacuguuug aauacacugn n 21

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer, caracterizado por que consiste en determinar la presencia de ProNGF en una muestra biológica que proviene de un paciente sospechoso de padecer cáncer.
- 5 2. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer según la reivindicación 1, caracterizado por que el cáncer es un cáncer de mama, de tiroides o de pulmón.
3. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer según la reivindicación 2, caracterizado por que el cáncer es un cáncer de mama.
4. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer según la reivindicación 2, caracterizado por que el cáncer es un cáncer de pulmón.
- 10 5. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer según la reivindicación 2, caracterizado por que el cáncer es un cáncer de tiroides.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la presencia de ProNGF se pone en evidencia por detección directa del ProNGF en dicha muestra biológica.
- 15 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que la detección del ProNGF se pone en práctica mediante un ensayo inmunológico o por espectrometría de masas.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado por que dicha muestra biológica está constituida de fluido biológico o de un tejido que proviene de la biopsia del tumor o de metástasis.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la muestra biológica está constituida de un tejido que proviene de la biopsia del tumor o de metástasis del paciente.
- 20 10. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la muestra biológica está constituida de fluido biológico, preferentemente previamente tratado para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que las células tumorales circulantes son después cultivadas en condiciones tales que segregan ProNGF.
- 25 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado por que las células tumorales circulantes son también cultivadas en condiciones que permiten el bloqueo de ProNGF en el interior de dichas células.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la detección de ProNGF se pone en evidencia por cultivo, en presencia de dicha muestra biológica, de células sensibles al ProNGF.
- 30 14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que dicha muestra biológica está constituida de una muestra de fluido biológico, preferentemente tratado para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que las células tumorales circulantes son después cultivadas en condiciones tales que segregan ProNGF.
- 35 16. Utilización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de recaídas en el ámbito del cáncer, siendo dicho cáncer preferentemente el cáncer de mama, de tiroides o de pulmón.
17. Utilización de un inhibidor de ProNGF para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de mama, de tiroides, de próstata, o de pulmón; caracterizada por que el inhibidor es un anticuerpo específico de ProNGF, las fracciones de anticuerpo específico del ProNGF, un análogo en forma soluble de un receptor de ProNGF, un siRNA de un receptor de ProNGF, un oligonucleótido antisentido de dicho receptor, un péptido derivado de ProNGF que ha conservado las propiedades de unión al receptor de ProNGF o un anticuerpo específico dirigido contra el receptor de ProNGF.
- 40 18. Utilización según la reivindicación 17, caracterizada por que dicho inhibidor de ProNGF se puso previamente en condiciones tales que penetra específicamente en las células de interés.
- 45 19. Composición farmacéutica, caracterizada por que comprende, a título de principio activo, al menos un inhibidor de ProNGF, para su utilización en el tratamiento del cáncer de mama, de tiroides, de próstata o de pulmón, caracterizada por que el inhibidor es un anticuerpo específico anti-Pro-NGF, las fracciones de anticuerpo específico del ProNGF, un análogo en forma soluble de un receptor de ProNGF, un siRNA de un receptor de ProNGF o un oligonucleótido antisentido de dicho receptor, un péptido derivado de ProNGF que ha conservado las propiedades de unión al receptor de ProNGF o un anticuerpo específico dirigido contra el receptor de ProNGF.
- 50

Figura 1

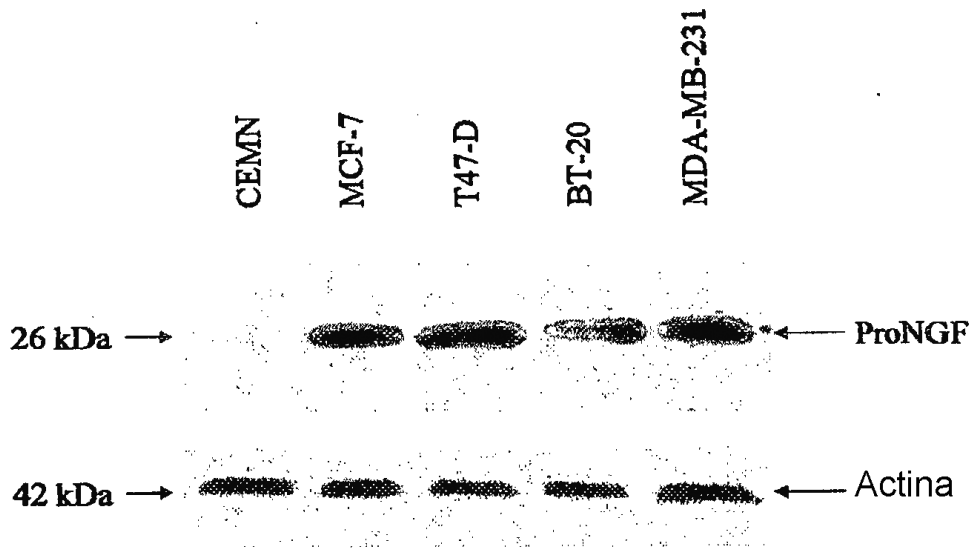


Figura 2

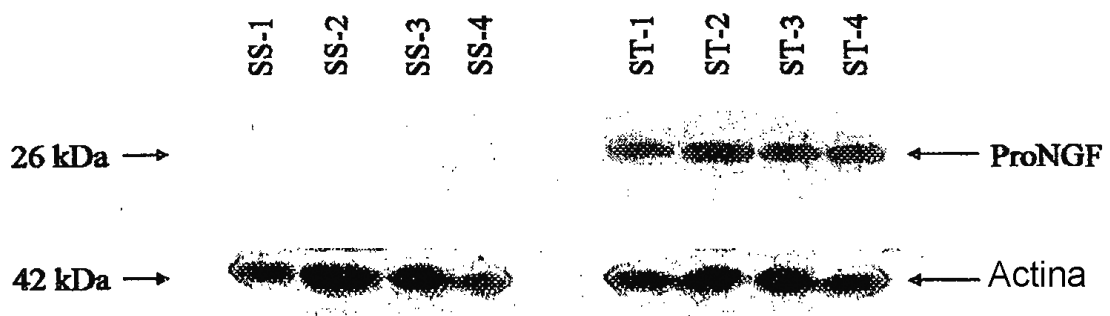


Figura 3

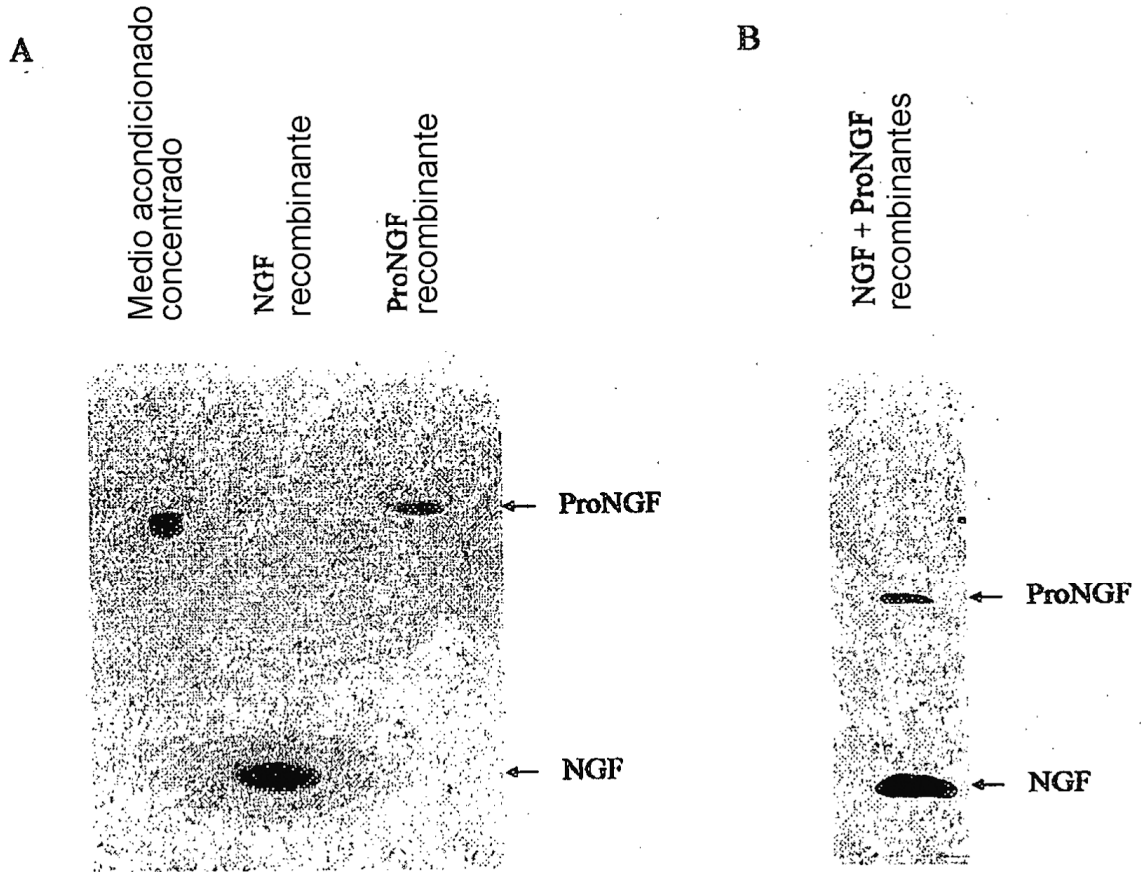


Figura 4

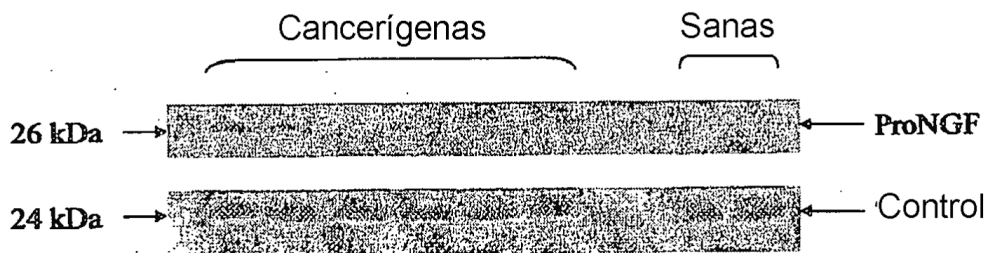


Figura 5

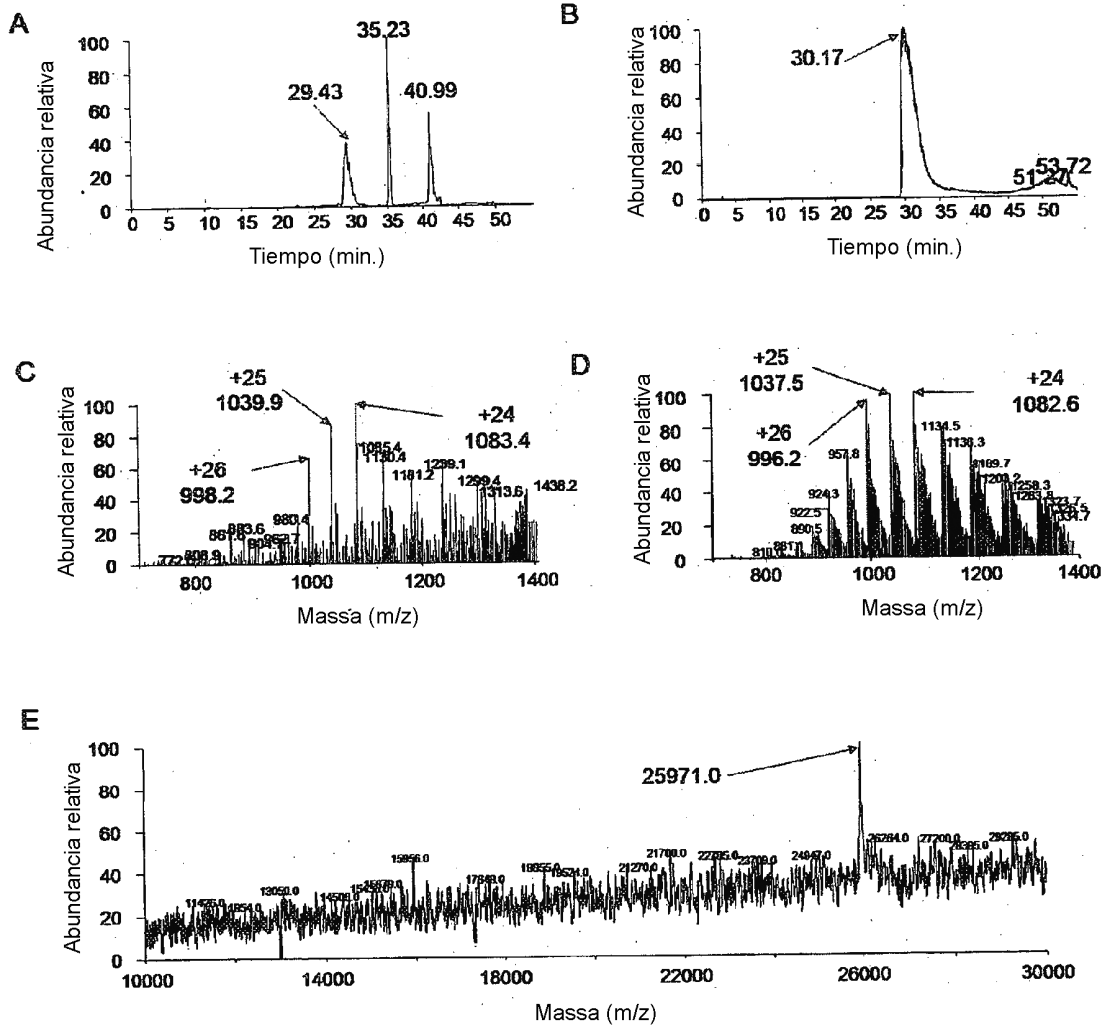


Figura 6

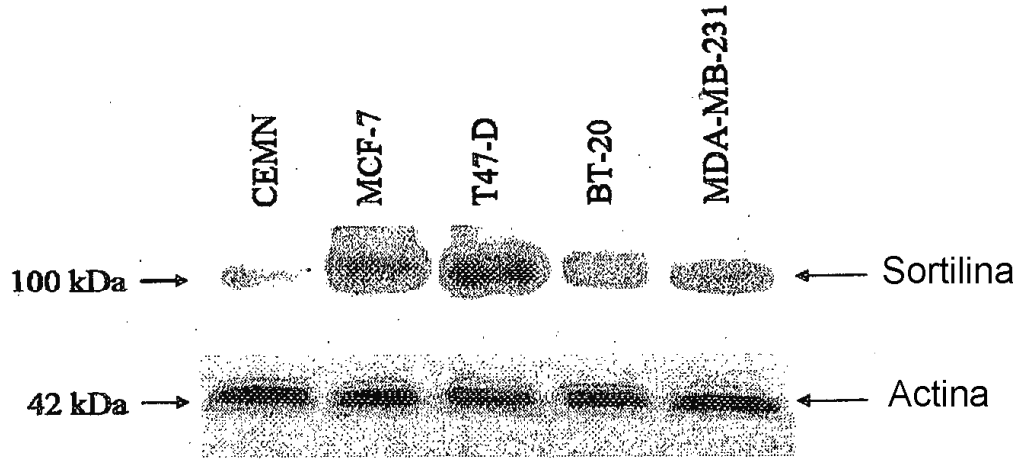


Figura 7

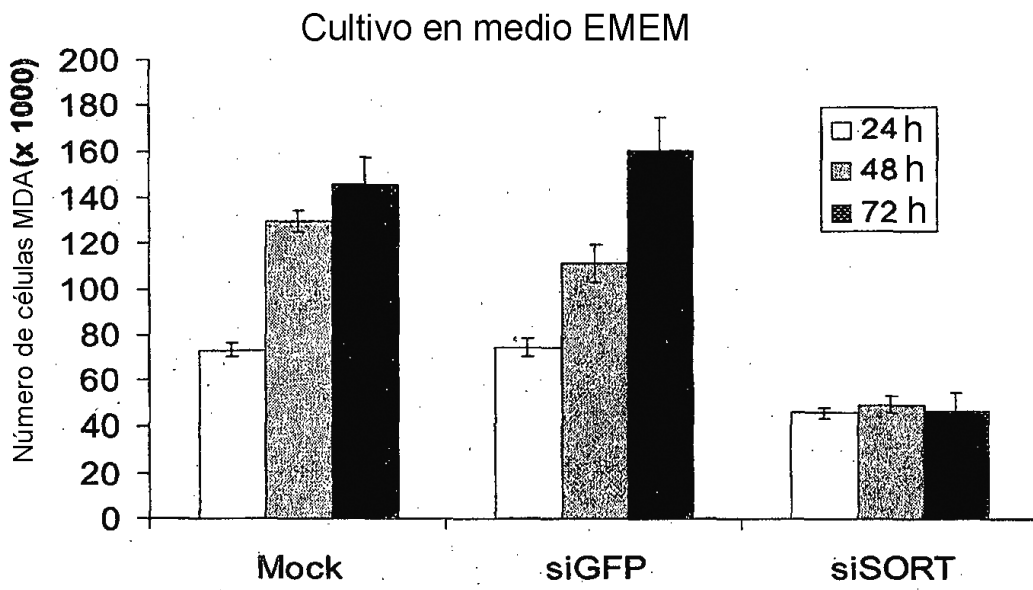


Figura 8

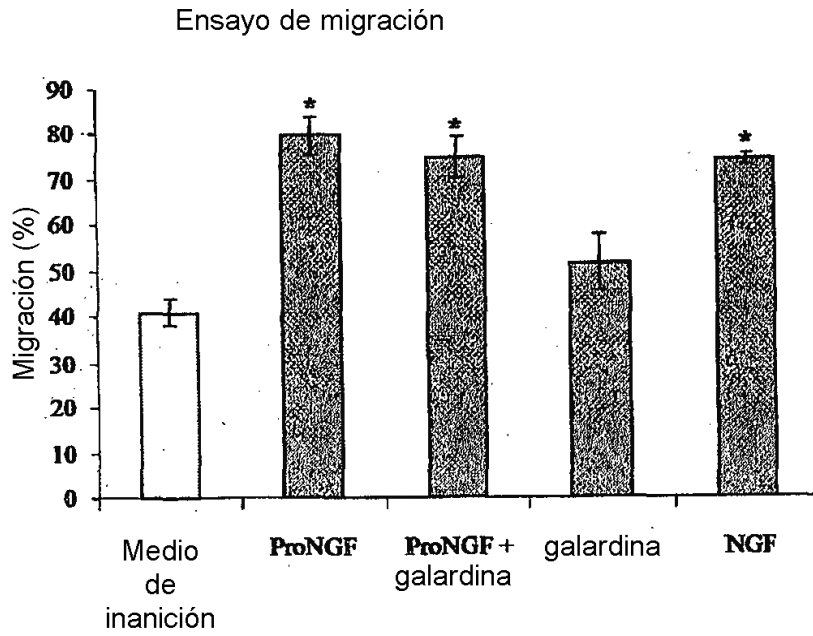


Figura 9

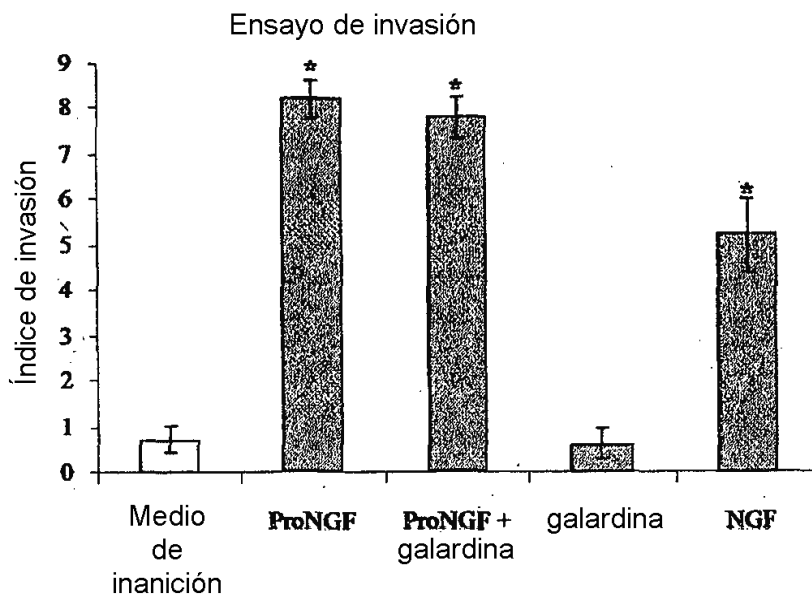


Figura 10

