

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 002**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2010 E 10700222 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2374003**

54 Título: **Métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la detección de cáncer de mama**

30 Prioridad:

07.01.2009 EP 09305011

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

16.06.2015

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FORGEZ, PATRICIA y
GOMPEL, ANNE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 538 002 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

Métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la detección de cáncer de mama

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la detección de cáncer de mama.

10 **Estado de la técnica**

El cáncer de mama es la causa más frecuente de muertes relacionadas con cáncer entre las mujeres en los países occidentales. Entre estas pacientes, una de cada cuatro mujeres muere de cáncer de mama, a pesar de las mejoras en el diagnóstico, la cirugía, la quimioterapia y las nuevas terapias dirigidas. La muerte está asociada con el desarrollo metastásico de la enfermedad. El descubrimiento y caracterización de nuevos contribuyentes sigue siendo necesario para desarrollar tratamientos apropiados y altamente específicos dirigidos al inicio de la metástasis y los procesos de progresión.

Durante 1997, se diagnosticaron más de 36.000 nuevos casos de carcinoma ductal in situ (DCIS), que representa el 17% de todos los nuevos cánceres de mama, en los Estados Unidos. La mayoría de estos casos se diagnosticó por mamografía. Una mamografía de alta calidad es capaz de encontrar una gama de lesiones no invasivas asintomáticas que no puede palparse. Éstas a menudo son más pequeñas, de inferior grado nuclear, y muestran cambios mucho más sutiles que las lesiones detectadas con equipos mamográficos menos avanzados en el pasado. Una mamografía técnicamente buena requiere una atención excepcional al detalle. La necesidad de experta interpretación radiológica no puede enfatizarse lo suficiente. El hallazgo mamográfico más común es las microcalcificaciones, pero algunas lesiones pueden presentarse como masas o distorsiones arquitectónicas con o sin microcalcificaciones. La imagen por resonancia magnética (MRI) de mama se ha aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) desde 1991 para su uso como herramienta suplementaria, además de la mamografía, para ayudar a diagnosticar cáncer de mama. La MRI es útil para estadificar el cáncer de mama, lo que determina el tratamiento más apropiado, y para el seguimiento de los pacientes después del tratamiento del cáncer de mama. Como la MRI es más sensible que la mamografía, puede ayudar a detectar cánceres que pueden pasarse por alto por mamografía. Sin embargo, como esta sensibilidad aumentada también puede conducir a resultados falsos positivos, que requiere procedimientos de biopsia de mama, la American Cancer Society no recomienda MRI para todas las mujeres.

La neurotensina (NTS) es un péptido de 13 aminoácidos formado a partir de un precursor grande, escindido por convertasas. La NTS es habitualmente conocida por su distribución a lo largo del tracto gastrointestinal. Las funciones fisiológicas típicas para NTS incluyen estimulación de secreciones pancreáticas y biliares, inhibición de la motilidad del intestino delgado y gástrica, y la facilitación de traslocación de ácidos grasos. Igualmente se informó de la NTS en funciones ligadas específicamente a progresión neoplásica, incluyendo proliferación de las células cancerosas de páncreas, próstata, colon, y pulmón. Se ha descrito previamente un papel potencial de NTS en progresión de tumor de mama (Souaze et al (2006) Cancer Res. 66:6243-6249).

Las funciones periféricas de NTS están mediadas a través de su interacción con NTSR1 (receptor 1 de neurotensina de alta afinidad). Cuando NTSR1 se estimula con NTS, los fosfatidil inositoles se hidrolizan conduciendo a movilización de Ca^{2+} y activación de PKC, ERK1/2, RhoGTPasas, NFkappa-B, y quinasa de adhesión focal (FAK).

El documento US 2005/112678 y el documento WO 2005/052194 describen métodos para el diagnóstico de cánceres en seres humanos utilizando NTSR1.

El documento WO 03/093828 proporciona ensayos para la identificación de compuestos útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades cancerosas.

El documento WO 2005/090603 describe métodos para detectar cáncer pulmonar no microcítico usando los genes expresados de forma diferencial KIF11, GHSR1b, NTSR1, y FOXM.

Somai et al: (2002) Biochemical and Biophysical Research Communications 295:482-488 describe métodos para tratar cáncer de mama usando neurotensina.

Garcia-Garayoa (2001) Nuclear Medicine and Biology 28:75-84 describe métodos para el diagnóstico de cáncer usando nuevos análogos de neurotensina.

La identificación de pacientes con fases iniciales patológicas pero con un alto riesgo de recidiva sería extremadamente útil, para adaptar individualmente el tratamiento adicional, en términos de seguimiento más estricto y/o tratamientos adyuvantes.

Objeto de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para determinar el pronóstico de un sujeto que padece cáncer de mama, que comprende la etapa de medir el nivel de expresión de NTRS1 en células cancerosas de mama obtenidas de dicho sujeto.

Por "medir el nivel de expresión de NTRS1", se entiende medir el porcentaje de las células cancerosas de mama que expresan NTRS1.

10 Una alta expresión de NTRS1 (tal como al menos el 50% o al menos el 60%, o al menos el 70% o al menos el 80% de las células cancerosas de mama expresan NTRS1) está asociada con un peor pronóstico, es decir, una tasa más baja de supervivencia.

15 Típicamente la expresión de NTRS1 puede medirse por ejemplo por RT-PCR o inmunohistoquímica realizada sobre una muestra obtenida por biopsia.

En la biopsia de cáncer de mama, sea un cáncer invasivo o in situ, la NTRS1 se cuantifica en las células cancerosas.

20 La presente invención también posibilita la evaluación del riesgo de recidiva de un sujeto que se ha tratado quirúrgicamente y posteriormente ha recibido el tratamiento apropiado (tal como radioterapia, quimioterapia y/o terapia hormonal).

25 Puede usarse un método de pronóstico de acuerdo con la invención en combinación con cualquier otro método ya usado para la evaluación pronóstica de cáncer de mama, incluyendo fase, demográfica y parámetros antropométricos, resultados de examen clínico o de laboratorio rutinario, incluyendo el tamaño del tumor, clasificación histopronóstica, receptores hormonales, oncotipo, mammaprint, uPA/PAI-1...

30 A continuación se ilustrará la invención mediante el siguiente ejemplo así como las tablas y figuras.

Descripción de las figuras

Figura 1: Expresión de neurotensina en tejido de mama normal

35 **A)** Izquierda, se transcribió de forma inversa un mg de ARN total de HBEC o glándula completa y se realizó un experimento de PCR específico para NTS. Derecha, se transcribió de forma inversa un mg de ARN total de células HBEC (control, tratado con estradiol (E2) 10 nM con o sin ICI 182780 1 μM). Se realizó un experimento de PCR usando cebadores específicos para NTS y GAPDH.

40 **B)** Ducto normal expuesto a anticuerpo contra NTS a dilución 1/500 (1), después de pre-incubación con el péptido antigénico durante 2 h a 10 nM (2), o sin anticuerpo primario (3), y lóbulo expuesto a anticuerpo contra NTS (4). Tejido normal expuesto a anticuerpo contra NTS a dilución 1/500 adyacente a ducto tumoral (5), lóbulo (6). El aumento original fue 200X.

Figura 2: Expresión de neurotensina en IDC.

45 **A)** Se realizó inmunohistoquímica de NTS sobre IDC, componentes ductal (1) e invasivo (2), aumento 200X para (1) y 400X para (2). **B)** Transcritos de NTS y NTSR1 en IDC. Se transcribió de forma inversa un mg de ARN total de 11 pacientes con IDC, y se realizó PCR específica para NTS, receptor NTSR1, o GAPDH (control). El grado SBR se indica debajo de cada línea. **C)** Ejemplo de co-localización regional de NTS y NTSR1 por
50 inmunohistoquímica para NTS (derecha) y NTSR1 (izquierda) al aumento original 400X.

Figura 3: Expresión de NTSR1 en IDC y duración de supervivencia global.

55 Análisis de Kaplan-Meier de la duración de supervivencia global en ambos grupos con baja (< 80%) y alta (≥ 80%) expresión de NTSR1. Probabilidad de muerte global para pacientes con alta expresión de NTSR1 (n=38) frente a pacientes con baja expresión de NTSR1 (n=68).

Figura 4: Caracterización de clones MCF-7 que sobre-expresan NTS

60 **A)** Análisis de transcritos para NTS, NTSR1, ER-alfa, y PR para clones de sobre-expresión, NTS-h con alta expresión de NTS, y NTS-1 con baja expresión de NTS, se comparan con células de tipo silvestre, MCF-7.

B) Tasa de proliferación celular para MCF-7 y NTS-h. El porcentaje de células para cada momento puntual se comparó con la cantidad de células originalmente sembradas.

65 **Figura 5: Imágenes planas de ratones desnudos hembra injertados con células NTS-h. Inyectados con un análogo DTPA(¹¹¹In)-NTS**

A) Imagen de un ratón que alberga un tumor grande. Fotografía (1), imagen de centelleografía plana a las 5 h (2) y 24 h (3) y 30 h después de la inyección (4). En 1, 2, 3, y 4 la flecha inferior muestra el tumor, en 4 la flecha superior muestra una metástasis al ganglio linfático axilar observada después de la disección animal.

B) Imagen de un ratón que alberga un tumor pequeño. Fotografía (1), imagen plana a los 60 min (2), 5 h (3), y 24 h (4) después de la inyección. La flecha muestra el tumor. Los riñones se indicaron por K, y la vejiga se indicó por B.

Los periodos de adquisición fueron de 0 a 60 min para el momento puntual a 1 h, y 45 min para los tres puntos a 5, 24 y 30 h.

Tablas

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes

	IDC n=106
Edad en años [media ± DT]	57,96 ± 14,04
Estado menopáusico	
Pacientes post menopáusicas [n (% de pacientes)]	69 (65%)
Edad de menopausia [media ± DT]	50,96 ± 3,05
Historia familiar de cáncer de mama [n/número de casos estudiados (% de pacientes)]	18/79 (23%)
Uso de HRT [n/número de casos estudiados (% de pacientes)]	17/92 (18%)
Seguimiento en meses [media ± DT]	67,9 ± 41,93
Receptor de estrógenos positivo [n/número de casos estudiados (% de pacientes)]	69/100 (69%)
Receptor de progesterona positivo [n/número de casos estudiados (% de pacientes)]	71/99 (71,7%)
Tamaño del tumor (cm) [media ± DT]	2,3 ± 1,43
Grado SBR [n]	
1	33
2	49
3	24
Número de pacientes N+ [n/número de casos estudiados (% de pacientes)]	42/104 (40,4%)
Número de ganglios invadidos [media ± DT]	1,32 ± 2,55
Recidiva durante el seguimiento [n (% de pacientes)]	26 (25%)
Muertes durante el seguimiento [n (% de pacientes)]	11 (10,4%)
Terapia adyuvante (número de casos estudiados)	
Radioterapia [n (% de pacientes)]	96 (94%)
Quimioterapia [n (% de pacientes)]	36 (35,5%)
Uso de tamoxifeno [n (% de pacientes)]	78 (76,4%)

SBR; Scarff Bloom y Richardson, n = número de pacientes, DT = desviación típica

Tabla 2: Factores de pronóstico y muertes estratificadas por expresión de NTS en los componentes ductal e invasivo de IDC

	NTS Componente ductal n=87			NTS Componente invasivo n =103		
	NO n=31	SÍ n=56	P	NO n=55	SÍ n=48	P
Receptor de estrógenos positivo [n/número de casos estudiados (DT)]				30/49	36/47	NS
Receptor de progesterona positivo [n/número de casos estudiados (DT)]				32/51	37/45	0,034
Tamaño del tumor (cm) [número de casos estudiados]	30	52		54	44	
[media ± DT]	2,36 ± 1,7	2,22 ± 1,25	NS	2,43 ± 1,7	2,03 ± 0,9	NS
Grado SBR [número de casos estudiados]	31	56		52	47	
1	7	21		16	17	
2	13	26		25	22	
3	11	9	NS	14	9	NS
Número de ganglios invadidos [número de casos estudiados]	30	54		52	48	
[mean ± DT]	1,17 ± 2,3	1,66 ± 3	NS	1,23 ± 2	1,49 ± 3	NS
Recidiva durante el seguimiento [n/n de pacientes estudiados]	6/31	14/56	NS	15/55	11/47	NS

Muertes durante el seguimiento [n/n de pacientes estudiados]	2/31	7/56	NS	5/55	6/48	NS
Terapia adyuvante	30	53		51	47	
Radioterapia [n]	29	50	NS	48	46	NS
Quimioterapia [n]	12	19	NS	19	16	NS
Uso de tamoxifeno [n]	25	38	NS	41	34	NS

Tabla 3: Factores de pronóstico y muertes estratificadas por expresión de NTSR1 en el componente invasivo de IDC

	NTSR1 n = 106		P
	<80% n=68	>80% n=38	
Receptor de estrógenos positivo [n/número de casos estudiados]	46/64	23/36	NS
Receptor de progesterona positivo [n/número de casos estudiados]	46/63	25/36	NS
Tamaño del tumor (cm) [número de casos estudiados]	68	38	0,007
[media (DT)]	2,08 ± 1,35	2,71 ± 1,4	
Grado SBR [número de casos estudiados]	68	38	
1	26	7	
2	31	18	
3	11	13	0,036
Número de ganglios invadidos [número de casos estudiados]	66	38	
[media ± DT]	0,86 ± 1,7	2,11 ± 3,4	0,05
Recidiva durante el seguimiento [n/número de casos estudiados]	13/67	13/38	0,09
Muertes durante el seguimiento [n/ número de casos estudiados]	2/68	9/38	0,0025
Terapia adyuvante (102 casos estudiados)	65	37	
Radioterapia [n]	61	35	NS
Quimioterapia [n]	17	19	0,01
Uso de tamoxifeno [n]	49	29	NS
NTS [n/número de casos estudiados]	28/65	20/37	NS

Tabla 4: Correlación de la subpoblación que co-expresa NTS y NTSR1 con los factores principales de pronóstico

	NTS componente invasivo n=48		P
	NTSR1 <80% n=28	NTSR1 >80% n=20	
Receptor de estrógenos positivo [n/número de casos estudiados]	24/27	12/20	0,049
Tamaño del tumor (cm)			
[número de casos estudiados]	28	20	
[media ± DT]	2,08 ± 1,15	2,37 ± 1,16	
Grado SBR [número de casos estudiados]	28	20	
1	14	3	
2	12	10	
3	2	7	0,011

Descripción detallada de la invención

5

Ejemplo

En la siguiente descripción, todos los experimentos de biología molecular para los cuales no se da protocolo detallado se realizan de acuerdo con el protocolo convencional.

10

Abreviaturas

NTS, neurotensina; NTSR1, receptor 1 de neurotensina de alta afinidad; IDC, carcinomas ductales invasivos; grado SBR, grado de Scarff-Bloom-Richardson, ER, receptor de estrógenos, PR, receptor de progesterona, HBEC, células

epiteliales de mama humana.

Sumario

- 5 Se investigó la expresión de NTS y NTSR1 en tejido de mama humana normal y en carcinomas de mama ductales invasivos (IDC) por inmunohistoquímica y RT-PCR. La NTS se expresa y regula positivamente por estrógenos en células de mama epiteliales normales. La NTS también se encuentra expresada en los componentes ductal e invasivo de IDC. La alta expresión de NTSR1 está asociada con el grado SBR, el tamaño del tumor, y la cantidad de ganglios linfáticos metastásicos. Además, la alta expresión de NTSR1 es un factor independiente de pronóstico.

10

Resultados

La expresión de NTS en células de mama epiteliales normales está regulada por estradiol

- 15 Se planteó que NTS también se expresa en tejido de mama humana normal, y se estudió el transcrito de NTS en glándulas mamarias normales, y en ocho diferentes cultivos de células epiteliales de mama humana (HBEC). Se detectó de forma coherente amplicón de NTS con baja a media intensidad. Se muestran ejemplos típicos en la figura 1A *izquierda*. Para evaluar si el gen de NTS también está regulado por estradiol en mama humana, se expusieron HBEC a estradiol. Como se muestra en la figura 1A *derecha*, se observó una potenciación de transcritos de NTS.
- 20 Este efecto se suprimió cuando se añadió ICI 182780, un anti-estrógeno puro, de forma concomitante a estradiol (Figura 1A *derecha*) lo que sugiere que los receptores de estrógenos participan en la regulación génica de NTS en tejido de mama humana. Corroborando estos resultados, se detectó de forma positiva la expresión de NTS por inmunohistoquímica en 19 (76%) biopsias de tejidos de mama normal de 25 mujeres premenopáusicas. Se observó marcaje de NTS en escasas células epiteliales de ductos y lóbulos (Figura 1B, 1 y 4). En el mismo portaobjetos se
- 25 apreció que las estructuras lobulares se marcaban con una tinción más intensa que las estructuras ductales. También se apreció que el tejido adyacente normal de carcinomas de mama ductales invasivos (IDC) muy a menudo se marcada por anticuerpos contra NTS, con similar intensidad y distribución celular que en el tejido de mujeres sanas (Figura 1B, 5 y 6).

30 Expresión de NTS en carcinomas de mama ductales invasivos

- Para evaluar el estado de NTS y NTSR1 en cáncer de mama se estudió su respectiva expresión en 106 IDC. Los detalles de los datos clínicos, características patológicas, y modulaciones de tratamiento se muestran en la tabla 1. Se clasificó la NTS en los componentes invasivo y ductal en los IDC de los pacientes. En la mayoría de los casos,
- 35 una gran cantidad de células se marcaron positivamente con anticuerpos contra NTS (Figura 2A). El marcaje NTS positivo en el componente invasivo está significativamente correlacionado con el marcaje positivo en el componente ductal ($P = 0,004$). En ambos casos, el marcaje de NTS fue citosólico (Figura 2A). Usando RT-PCR, se confirmó la alta expresión de transcrito de NTS en 9 de 11 tejidos de cáncer de mama (Figura 2B). Cinco pacientes mostraron una expresión muy fuerte de transcrito de NTS (Figura 2B, carril 2-6) y otros cuatro presentaron una expresión más débil (Figura 2B, carril 7-9 y 11). No se observó correlación con los factores de pronóstico y la progresión de la enfermedad (tamaño del tumor, grado, cantidad de ganglios invadidos, recidiva, y muerte) con la expresión de NTS, ni en el componente ductal ni en el invasivo (Tabla 2). La única correlación encontrada, fue entre la expresión de PR y NTS en el componente invasivo. La NTS no es un marcador ni está asociada con la progresión del tumor en
- 40
- 45

Expresión de NTSR1 en IDC

- La tinción de NTSR1 en IDC mostró que la expresión de NTSR1 se extendía por muchas células tumorales en los componentes invasivo y ductal. El marcaje fue granular y principalmente citosólico. En el componente invasivo de los IDC estudiados, la mayoría mostraban una alta proporción de células NTSR1 positivas (del 50 al 100%). Se planteó que los efectos nocivos de la NTS deben suceder en tumores que contienen una proporción muy alta de células que expresan NTSR1. Nos centramos en el 35% de los pacientes en que el 80% o más de las células tumorales expresaban NTSR1. La expresión de NTSR1 se verificó por RT-PCR sobre tejidos congelados de 11 pacientes. Como se muestra en la Figura 2B, tres pacientes expresaron NTSR1 (carril 3, 6, 9) mostrando dos de ellos una
- 50
- 55

- Las características de las mujeres que muestran alta expresión de NTSR1 ($\geq 80\%$ de células tumorales) se muestran en la tabla 3. La alta expresión de NTSR1 estaba asociada con un tamaño de tumor más grande ($p < 0,01$), el grado SBR 3 ($p < 0,05$), la cantidad de ganglios linfáticos positivos ($p < 0,05$), y como consecuencia de ellos también estaba asociada con quimioterapia ($p < 0,01$). Usando análisis univariado se descubrió que los pacientes con alta expresión de NTSR1 tenían un pronóstico significativamente peor que aquellos con baja expresión de NTSR1 (tasa de diez años de supervivencia del 66,2% frente al 96,5%; $p = 0,01$). El gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier hasta 10 años, y el número de pacientes en riesgo durante este periodo de tiempo se muestran en la Figura 3. El análisis multivariado con un modelo Cox ajustado para factores principales de riesgo de pronóstico, edad, tamaño del tumor,
- 60
- 65
- grado SBR, estado ER positivo y ganglios linfáticos, mostró que la alta expresión de NTSR1 seguía siendo un marcador de pronóstico independiente. El riesgo relativo de muerte en mujeres con expresión de NTSR1 $\geq 80\%$ en

comparación con mujeres con expresión de NTSR1 < 80% estaba significativamente aumentado (RR = 5,29, intervalo de confianza del 95% [1,04 - 26,88], p= 0,044).

Regulación paracrina de NTSR1

5 En las 48 pacientes que expresan NTS en el componente invasivo, 20 (42%) mostraron alta expresión de NTSR1 (\geq 80%), correspondiente al 20% de la población total. Examinando secciones tisulares adyacentes de estas pacientes, se detectó una clara co-localización regional del ligando y su receptor en todos los IDC (Figura 2C). En la población que co-expresa NTS y NTSR1, la distribución entre los grados SBR estaba alterada en comparación con la población total, con pocos pacientes en el grado 1 y la mayoría de los pacientes en el grado 3 ($p < 0,05$). El tamaño el tumor, la recidiva y la cantidad de muertes fueron mayores en esta subpoblación que en la población total. Además, la positividad ER alfa, caracterizada como un marcador diferenciado y de buen pronóstico, estaba correlacionada con la expresión de NTS y baja de NTSR1 ($p < 0,05$) (Tabla 4).

15 MCF-7 que expresan NTS

Para evaluar el papel de NTS en la progresión de cáncer de mama, se transfectaron de forma estable células de cáncer de mama dependiente de hormonas, MCF-7, con secuencia codificante de NTS. Se seleccionaron dos clones con expresión diferencial de NTS en base a la cantidad de transcrito de NTS, NTS-h con alta expresión de NTS, 20 NTS-1 con baja expresión de NTS (Figura 4A). La expresión de NTS no cambió la expresión de los receptores de esteroides, ER alfa y PR (Figura 4A). Los clones que expresan NTS aún eran sensibles a tratamiento hormonal con estradiol y progesterona (datos no mostrados). Como se muestra en la figura 4B, no se detectó diferencia en la tasa de proliferación celular entre células de tipo silvestre y NTS-h. No obstante, cuando se xenoinjertaron células MCF-7 y NTS-h en ratones desnudos, solamente las células NTS-h indujeron tumores.

25

Detección de tumor

Para demostrar la posible detección de tumor usando la expresión de NTSR1 en células mamarias, se realizaron imágenes de centelleografía plana con un análogo DTPA(¹¹¹In)-NTS en dos ratones. Se ensayaron un ratón que albergaba un tumor grande (Figura 5A) y un ratón que albergaba un tumor pequeño, 2100 mg y 146 mg, respectivamente. Se observó claramente la acumulación de análogo DTPA(¹¹¹In)-NTS en tumores en imágenes planas adquiridas en momentos prematuros y tardíos: 1, 5 y 24 h después de la inyección. Los riñones y la vejiga fueron los únicos sitios donde se acumuló la radiactividad en órganos normales, observada principalmente a 1 y 5 h después de la inyección. De forma notable, las imágenes de centelleografía realizadas después de 30 h después de la inyección en los ratones que albergaban un tumor grande mostraron acumulación de radiactividad en el área de ganglios linfáticos homo-laterales (véase la figura 5A panel 4 flecha superior). Después de disección animal, se detectaron dos ganglios linfáticos axilares metastásicos de 187 y 90 mg respectivamente. El peso del ganglio linfático contra-lateral era de 30 mg.

40 Conclusiones

Se evaluó el estado de NTSR1 como un contribuyente en la progresión de cáncer de mama humano. Un enfoque para abordar esta cuestión es determinar si la regulación paracrina de NTS está asociada con el mal resultado de los pacientes. Se sospechaba que la contribución de NTSR1 en tumorigénesis sucedía a partir de la activación local y sostenida del receptor en lugar de la NTS en circulación, porque la NTS es un péptido altamente degradable y su concentración en sangre desciende rápidamente después de su liberación. Se ha demostrado que la activación sostenida de NTSR1 provoca el reciclado persistente de NTSR1 así como la activación de señalización, incluyendo ERK1/2 (Toy-Miou-Leong et al. (2004) J.Biol.Chem. 279:12636-12646), y causa activación génica sostenida de MMP9 y Bcl-2 (Souaze et al (2006) Cancer Res. 66:6243-6249). En tumor humano, estas condiciones se satisfarían si NTS se sintetizara y liberara en las cercanías de células que expresan NTSR1. La expresión de NTSR1 es un evento temprano de transformación celular, a causa de la resultante activación del promotor de NTSR1 por la vía de Wnt/ β -catenina (Souaze et al. (2006) carcinogenesis 27:708-716). Aquí se demuestra que el NTSR1 se expresa a alto nivel (\geq 80%) en el 35% de los pacientes con un marcaje granular principalmente citosólico que sugiere una endocitosis intensa del receptor.

55 Se observó expresión de NTS y ARNm de NTS en HBEC y se demostró que NTS es un gen diana de estrógenos en esas células. También se observó expresión de NTS en células tumorales de los componentes ductal e invasivo en IDC de mama, con una fuerte correlación estadística de la expresión de NTS en ambos componentes. Este último hallazgo, con una repartición similar de NTS en los pacientes de baja o alta expresión de NTSR1, indica que el gen de NTS sigue expresándose de forma constitutiva durante el proceso neoplásico, en lugar de desregularse. En paralelo, se observó una frecuente co-localización regional de ambos marcadores en secciones tisulares adyacentes del mismo tumor, lo que sugiere activación de NTSR1. Junto con la expresión de NTSR1, estos datos validan nuestra hipótesis de la regulación paracrina de NTS de células epiteliales transformadas durante el proceso neoplásico, con NTS liberada del tejido de mama normal adyacente o del tumor de mama.

65 La alta expresión de NTSR1 estaba significativamente asociada con el grado SBR, el tamaño del tumor, y la

cantidad de ganglios linfáticos metastásicos, y finalmente con la muerte de los pacientes. Estos hallazgos apuntan a que el mal pronóstico atribuido a pacientes con IDC de alta expresión de NTSR1 puede relacionarse directamente con la expresión de su ligando natural NTS, con la activación continua de NTSR1, que conduce a supervivencia potenciada de las células cancerosas, potencial invasivo, y metástasis.

5 Experimentos usando células que expresan NTS de forma ectópica confirman esta hipótesis. Como la expresión de receptores de esteroides no estaba afectada por NTS en estas líneas celulares, solamente las células que expresaban de forma elevada NTS eran capaces de desarrollar tumores cuando se xenoinjertaban en ratones sin suplementación con estradiol. El crecimiento tumoral está ausente en células MCF-7 de tipo silvestre en estas
10 condiciones mientras que en células que expresan NTS, se observaban tumores con un lento proceso (≥ 6 meses). También se observó formación de tumor en células MCF-7 que expresaban NTS, cuando las células se inyectaban en la glándula mamaria y los ratones se trataban diariamente con estradiol. En estas condiciones, el crecimiento tumoral es un proceso más rápido que muestra tumores de 350 mg después de 2 meses de crecimiento (datos no mostrados).

15 Además, fuimos capaces de demostrar el beneficio de usar un análogo de NTS marcado para la detección de tumores de mama en una fase prematura de cáncer de mama o para la detección de metástasis de cáncer de mama. Se han mostrado dos ejemplos. Un tumor pequeño con una tasa lenta de crecimiento, que expresa receptor de esteroides, fue detectable con un análogo de NTS marcado. Este tumor generado sobre un largo periodo de
20 tiempo con células bien diferenciadas indica que este enfoque experimental permite la detección de tumores que expresan NTSR1 en fases prematuras de cáncer de mama. El marcaje de tumor más grande y la tinción de la metástasis en el área axilar indican el posible uso de imágenes usando análogos de NTS marcados para la detección de sitios metastásicos distantes.

25 En conclusión, en base a una serie de 106 pacientes con cáncer de mama ductal invasivo, se proporcionaron evidencias de NTS/NTSR1 como contribuyente a la progresión de cáncer de mama. La identificación de pacientes con cáncer de mama caracterizados por vía de señalización NTS/NTSR1 paracrina, evidenciada en el presente estudio, proporciona estrategias alternativas para mejorar el tratamiento de IDC. Estos hallazgos dan soporte al potencial terapéutico de la inhibición de NTS/NTSR1 o direccionamiento celular de fármacos a través de NTSR1 en
30 fases avanzadas de cánceres de mama humanos. Los experimentos de imágenes fomentan fuertemente el concepto del uso de análogos de NTS para detección temprana y tardía de tumores de mama humanos y su sitio metastásico que expresa NTSR1.

35 Pacientes y métodos

Biopsias de mama

Se estudiaron los archivos clínicos de 106 pacientes completamente resecaadas para cánceres de mama ductales invasivos (IDC) por tumorectomía o mastectomía, en el Gynecology Department, Hôtel-Dieu Hospital, París. Las
40 pacientes se diagnosticaron por el mismo oncólogo durante un periodo de junio de 1984 a mayo de 1998. La información clinico-patológica se obtuvo de forma retrospectiva de los registros de las pacientes. Se midieron las duraciones de supervivencia y seguimiento como el tiempo time entre la primera confirmación histológica de cáncer de mama y la última consulta en el departamento, o muerte. Los registros de las pacientes se revisaron de forma retrospectiva para las características demográficas, los datos clínicos, el resultado, y la supervivencia. El diagnóstico
45 histológico se comprobó de forma rutinaria por examen microscópico de secciones teñidas con hematoxilina-eosina.

Inmunohistoquímica

Se analizaron secciones de tumor de mama 5 mm de grosor por inmunohistoquímica para tinción de NTSR1, NTS, ER, y PR, usando los siguientes anticuerpos: un anticuerpo policlonal de cabra contra NTSR1 (C-20 Santa Cruz
50 EEUU), un anticuerpo de conejo contra NTS (NA1230 Biomol, EEUU), un anticuerpo monoclonal contra ER- α (Santa Cruz), un anticuerpo monoclonal contra PR (Santa Cruz). La inmunotinción se realizó sobre secciones desparafinizadas usando el método de complejo de estreptavidina biotina peroxidasa descrito previamente por Souazé et al. (Souaze et al. (2006) Cancer Res. 66:6243-6249). Todos los portaobjetos se tiñeron con contraste con hematoxilina. Se realizó una estimación semi-cuantitativa de la cantidad de células positivas contando 1.000 células reactivas y no reactivas en diez campos sucesivos al aumento original 200 X.

Tejidos de mama normales

60 Se cultivaron células epiteliales de mama humana (HBEC) normales como se ha descrito previamente en Gompel et al. (Gompel et al. (1986) J.Clin.Endocrinol.Metab 63:1174-1180). Se obtuvieron biopsias adicionales de tejidos de mama normal de 25 mujeres premenopáusicas de diversas edades (18-50 años) que experimentaron cirugía plástica de acuerdo con las regulaciones francesas sobre experimentación clínica.

65

Extracción de ARN y RT-PCR

Los protocolos para la extracción del ARN total, la reacción de transcripción inversa (RT), y PCR están documentados en Souaze et al. (Souaze F, Rostene W, Forgez P (1997) J.Biol.Chem. 272:10087-10094). La RT se realizó sobre 1 µg de ARN total usando un cebador de NTSR1 específico (5'-GCTGACGTAGAAGAG-3' SEC ID N° 3) o 50 pmol de oligo dT y oligo dN. La amplificación por PCR se realizó sobre 1:5 v/v de la reacción de RT usando 25 pmol de cada cebador 5'-CGTGGAGCTGTA-CAACTTCA-3' SEC ID N° 4 y 5'-CAGCCAGCAGACCACAAAGG-3' SEC ID N° 5 para NTSR1, y 5'-AAGCACATGTTCCCTCTT-3' SEC ID N° 6 y 5'-CATACAGCTGCCGTTTCAGA-3' SEC ID N° 7 para NTS, y 1 unidad de Taq polimerasa (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia). El perfil de amplificación consistía en desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 57°C durante 45 s, y extensión a 72°C durante 45 s. El ciclo de PCR estuvo precedido por desnaturalización a 95°C durante 15 min y estuvo seguido de una extensión final a 72°C durante 7 min.

Tratamientos hormonales

Se sincronizaron las HBEC durante 40 h en medio libre de rojo fenol Ham F10 que contenía lovastatina 20 µM. La sincronización se detuvo añadiendo mevalonato 2 mM al medio que contenía hormonas. Posteriormente, las células se trataron 48 h en un medio libre de rojo fenol que contenía un 5% de suero humano compatible con estradiol (E2) 10 nM con o sin ICI 182780 1 µM.

Líneas celulares que expresan NTS y formación de tumores

Se transfectaron células MCF-7 por el vector que expresa la secuencia codificante de NTS. Se obtuvieron clones estables usando selección con antibiótico genético. Se eligieron dos clones con expresión diferencial de NTS, NTS-h con alta expresión, y NTS-1 con baja expresión. Se inyectaron 3 millones de células con MCF-7 o NTS-h por vía subcutánea en el costado de ratones desnudos. Solamente los ratones xenoinjertados con células NTS-h desarrollaron tumores sobre largos periodos, 9 meses para los experimentos aquí presentados.

Imágenes por centelleografía

Se realizaron imágenes por centelleografía, con anestesia por pentobarbital después de inyección *iv* de análogo DTPA(¹¹¹In)-NTS (30-50 pmol, 11,1 MBq), usando un sistema especializado IMAGER-S/CT de animal pequeño (Biospace Mesures) equipado con colimadores paralelos (matriz 128_128, ventana de energía del 15% centrada en dos picos 171 y 245 KeV). La adquisición plana se realizó de 0 a 60 min después de la inyección para el momento puntual 1 h, y durante 45 min para los otros momentos puntuales.

Estadística

Los análisis se procesaron con StatView Versión 5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA., EEUU). Se realizó estadística descriptiva para cada variable; los resultados cuantitativos se presentan como la media ± DT y los resultados cualitativos se presentan como una distribución de un número de pacientes. Para comparar los dos grupos, se usó ensayo χ^2 para variables cualitativas y ensayo t para variables cuantitativas. Se aceptó un valor $p < 0,05$ como significativo. El análisis de supervivencia se realizó por el método de Kaplan-Meier y la comparación con ensayo de rango Log. Para análisis multivariado, se realizó el modelo Cox usando el paquete estadístico R asociado con la muerte de pacientes. Estos datos apoyan la activación de vías perjudiciales neurotensinérgicas en la progresión de cáncer de mama.

Referencias

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERM

<120> Métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la detección de cáncer de mama

<130> BEP080670

<160>7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211>21

<212> ADN

ES 2 538 002 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNpi	
5	<400> 1 aagaagttca tcagcgccat c	21
	<210>2	
10	<211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> ARNpi	
	<400> 2 gcaatgttga caatatacc	19
20	<210>3 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador	
	<400>3 gctgacgtag aagag	15
30	<210>4 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 4 cgtggagctg tacaactca	20
40	<210>5 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 5 cagccagcag accacaaagg	20
50	<210>6 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 6 aagcacatgt tccctctt	18
60	<210>7 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65		

<220>
<223> cebador

5 <400> 7
catacagctg ccgtttcaga 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el pronóstico de un sujeto que padece cáncer de mama, que comprende la etapa de medir el nivel de expresión de receptor 1 de neurotensina (NTRS1) en células cancerosas de mama obtenidas de dicho sujeto, en el que una alta expresión de NTRS1 está asociada con un peor pronóstico.
5
2. El método de la reivindicación 1, en el que la expresión de NTSR1 se mide por RT-PCR o inmunquímica realizada sobre una muestra obtenida por biopsia.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el cáncer es un cáncer invasivo.
4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el cáncer es un cáncer in situ.
- 15 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el método se usa para evaluar el riesgo de recidiva de un sujeto que se ha tratado quirúrgicamente.

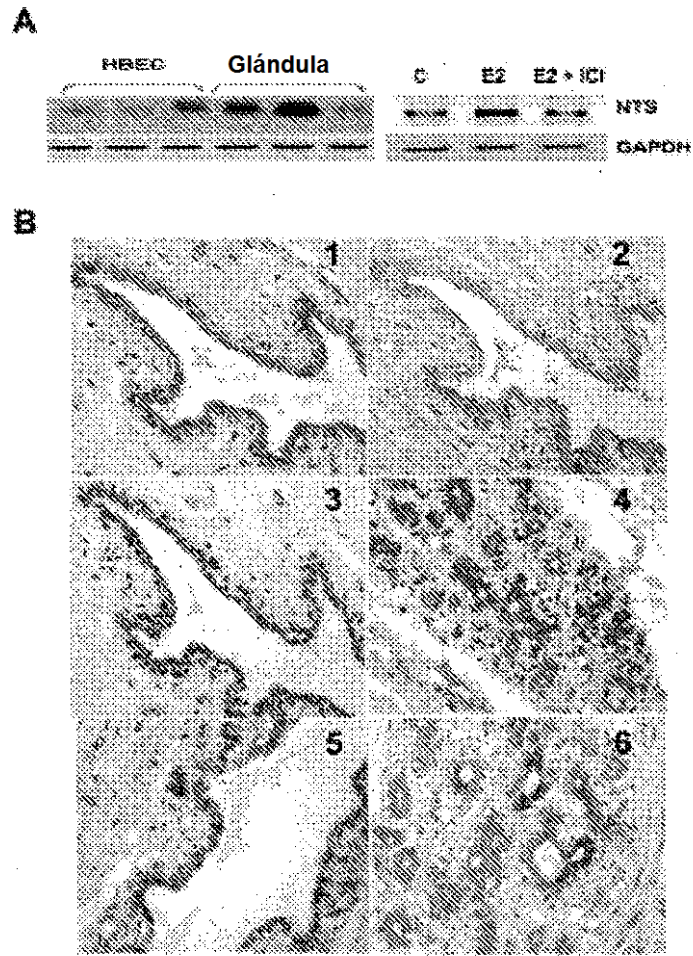


Figura 1

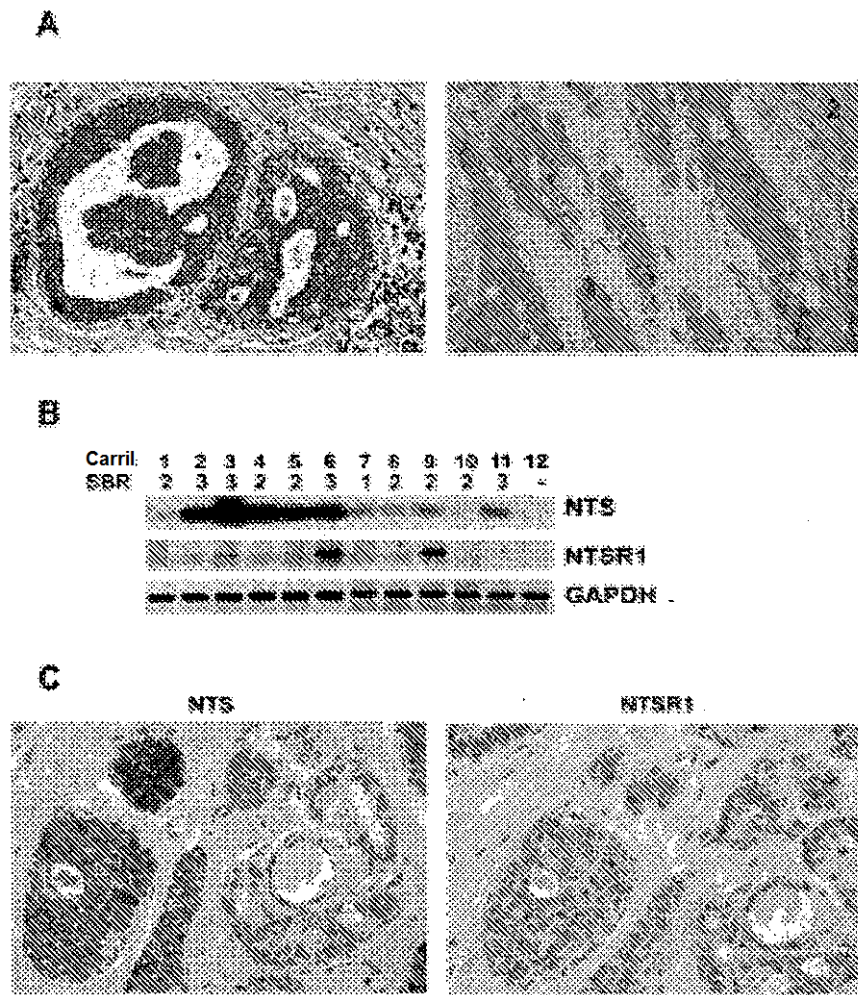


Figura 2

Seguimiento global (meses)

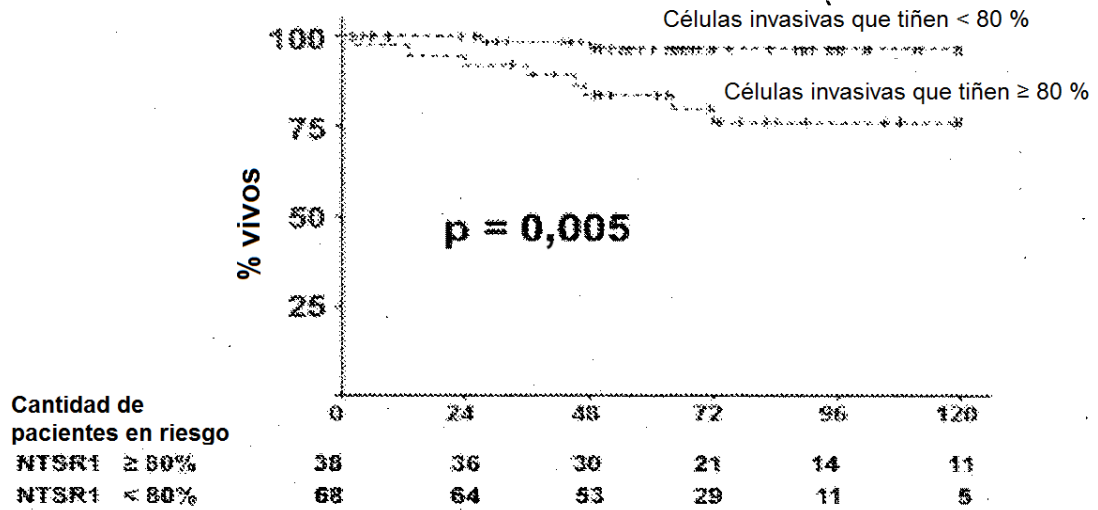
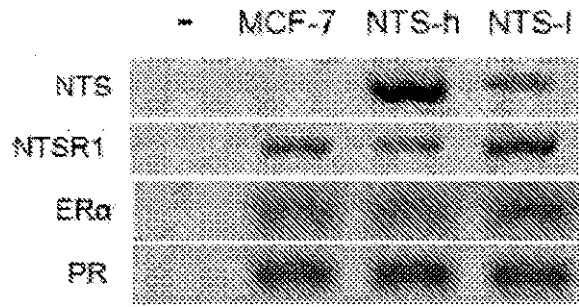


Figura 3

A



B

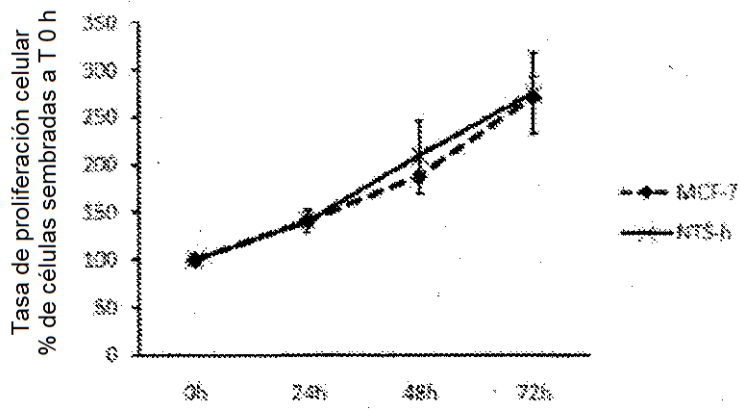


Figura 4

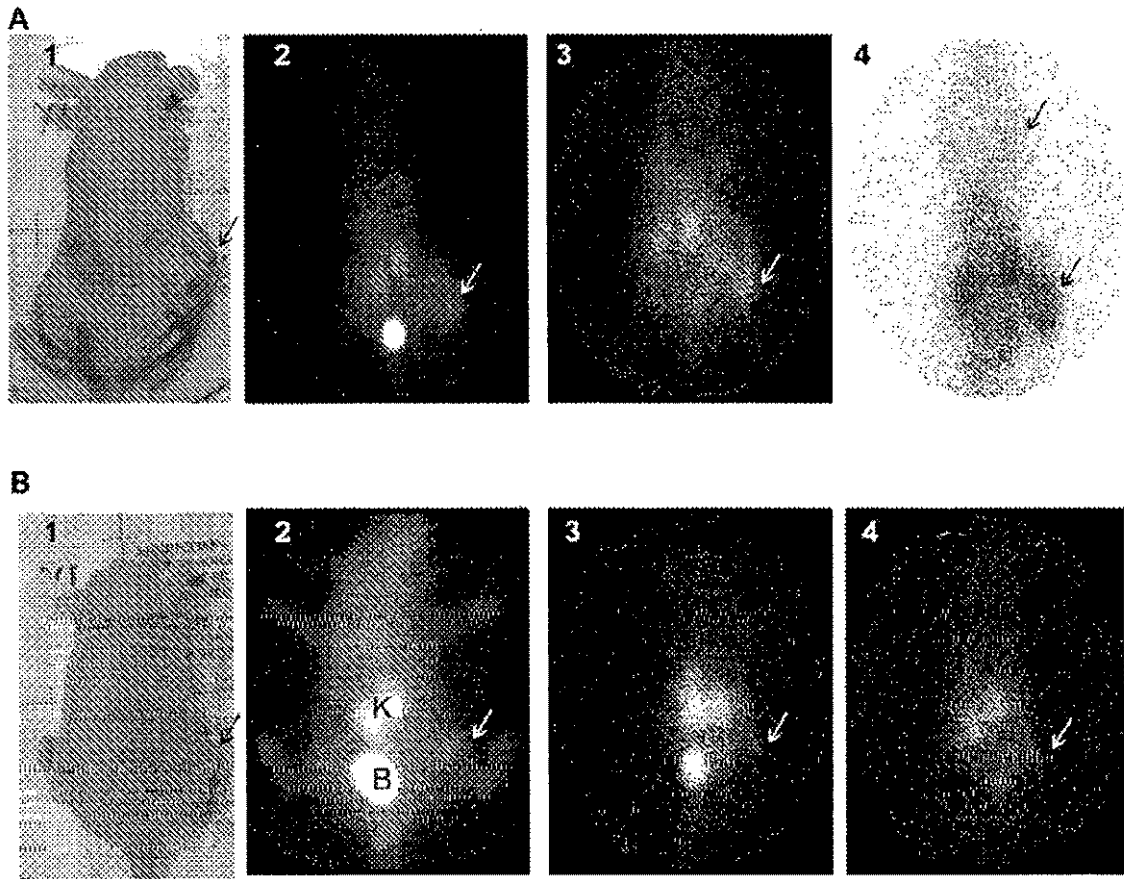


Figura 5