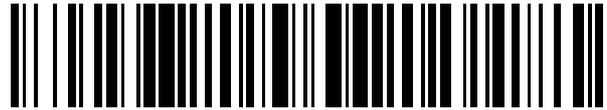


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 932**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009 E 09733469 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2265286**

54 Título: **Métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la estadificación de cáncer no microcítico de pulmón**

30 Prioridad:

16.04.2008 EP 08300180

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

30.09.2016

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(50.0%)**

3 Avenue Victoria

75004 Paris, FR y

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)**

72 Inventor/es:

ALIFANO, MARCO y

FORGEZ, PATRICIA

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 584 932 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 estadificación de cáncer no microcítico de pulmón

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la estadificación de adenocarcinoma de pulmón.

10 **Estado de la técnica**

Durante el proceso neoplásico, los complejos de neuropéptido-receptores a menudo están desregulados. Estos complejos acoplan varias rutas oncogénicas concomitantes y bien descritas, causadas por una regulación autocrina o paracrina anómala y dan como resultado el aumento de la progresión del cáncer (Heasley LE. *Oncogene* 20(13):1563-9, 2001). Entre estos complejos implicados en la progresión del cáncer se encuentra la Neurotensina (NTS) de 13 aminoácidos y su receptor de neurotensina de tipo 1 (NTSR1) correspondiente de alta afinidad. La NTS, que está localizada principalmente en tracto gastrointestinal, participa en funciones fisiológicas locales modulando la liberación de sustancias importantes, tales como secreciones pancreáticas y biliares, sustancia P, prostaglandina y otras. Se encuentra expresión de NTSR1 en tumores humanos principalmente de origen epitelial, tales como colon, páncreas, próstata y mama (Evers BM. *Peptides* 27(10):2424-33 2006; Souza F *et al.*, *Cancer Res* 66(12):6243-9 2006).

La expresión de NTSR1 está presente en cantidades mínimas o está ausente en las células epiteliales normales. Sin embargo, está inducida en los primeros estadios de la carcinogénesis por la activación de la ruta Wnt/beta catenina (Elek J *et al.* *Anticancer Res* 20(1A):53-8, 2000; Souza F *et al.* *Carcinogenesis* 27(4):708-16, 2006). La activación de NTSR1 conduce a la proliferación, supervivencia, movilidad e invasividad celular en tipos específicos de células cancerosas mediante la señalización a través de PKC, ERK1/2, RhoGTPasas, NFkappa-B, o la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) (Leyton J *et al.*, *Eur J Pharmacol*; 442(3):179-86, 2002; Ehlers RA *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 269(3):704-8, 2000; Zhao D *et al.*, *Mol Pharmacol* 67(6):2025-31,2005). Se demostró que el complejo NTS-NTSR1 estaba implicado en el crecimiento tumoral al interrumpir la ruta neurotensinérgica, mediante un antagonista específico, en tumores experimentales generados en ratones desnudos a partir de células cancerosas de colon, mama y células pequeñas de pulmón, y por lo tanto causaba una fuerte reducción en el crecimiento tumoral (Souza F *et al.* *Cancer Res* 66(12):6243-9 2006, Moody TW *et al.* *Peptides* 22(1): 109-15, 2001; Maoret JJ *et al.* *Int J Cancer* 80(3):448-54, 1999).

El cáncer no microcítico de pulmón es la causa principal de muertes relacionadas con el cáncer. El tamaño del tumor primario, la invasión de nódulos locoregionales y la presencia de metástasis distantes determina la tasa de supervivencia. Estos parámetros se usan para definir el estadio de la enfermedad y decidir el tratamiento óptimo para el paciente.

A pesar del progreso en los tratamientos médicos y quirúrgicos, la supervivencia a largo plazo sigue siendo baja, variando los valores globales del 10 al 20 % a los 5 años. La quimioterapia, en general, tiene un impacto limitado sobre la supervivencia cuando se usa como tratamiento adyuvante después de la cirugía, o como tratamiento primario en sujetos con metástasis. En el momento actual, el impacto de fármacos dirigidos por moléculas sobre el resultado de los pacientes con cáncer de pulmón también está limitado (Heasley LE. *Oncogene* 20(13):1563-9, 2001).

Los pacientes operables tienen una tasa de supervivencia global en 5 años de aproximadamente un 40 % y entre ellos, los que tienen la enfermedad de estadio I experimentan cifras del 60-70 % únicamente. La identificación de los pacientes con estadios iniciales patológicos, pero con un alto riesgo de recurrencia sería extremadamente útil para adaptar individualmente los tratamientos adicionales, en lo que respecta a un seguimiento más estricto y/o tratamientos adyuvantes (Scott WJ *et al.*, *Chest*. Enero 2003; 123(1 Suppl):188S-201S). Takahashi *et al.*, 2006, *Cancer Res.*, 66(19), 9408-9419 y el documento WO2005/090603 desvelan que la ruta de señalización oncogénica neuromedina U-receptor de secretagogos de hormona de crecimiento 1b/receptor de neurotensina de tipo 1 es una diana terapéutica para el cáncer de pulmón.

Por lo tanto, los objetivos de la presente invención son proporcionar métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la estadificación del adenocarcinoma de pulmón.

55 **Objeto de la invención**

La presente invención describe que el receptor de neurotensina de tipo 1 (NTSR1) se expresa en células de adenocarcinoma de pulmón y que la activación de NTSR1 conduce a la proliferación, supervivencia, movilidad e invasividad celular en las células de adenocarcinoma de pulmón. La presente invención también describe que la expresión de NTSR1 puede usarse como marcador para distinguir entre la agresividad de los tumores del cáncer no microcítico de pulmón.

La presente invención también se refiere a un método para determinar el pronóstico de un sujeto que padece adenocarcinoma de pulmón, que comprende la etapa de detectar la expresión de NTSR1 en células de cáncer no microcítico de pulmón, obtenidas de dicho sujeto, donde la presencia de la expresión de NTSR1 indica que el sujeto tiene un mal pronóstico.

La invención también se refiere a un inhibidor de la activación por neurotensina de NTSR1 para uso en el tratamiento de adenocarcinoma de pulmón, donde dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en un agente que regula negativamente la expresión de neurotensina, un anticuerpo contra neurotensina y un fragmento del mismo que se une a neurotensina.

5

Descripción detallada de la invención

También se proporciona un inhibidor de la activación por neurotensina del receptor de neurotensina de tipo 1 (NTSR1) para uso en el tratamiento de adenocarcinoma de pulmón.

10 La expresión "inhibidores de la activación por neurotensina de NTSR1" debe entenderse en sentido amplio. Esta expresión se refiere a agentes que regulan negativamente la expresión de la neurotensina, a compuestos que se unen a la neurotensina (NTS).

15 Los inhibidores de la activación por neurotensina de NTSR1 se seleccionan del grupo que consiste en un agente que regula negativamente la expresión de neurotensina y un anticuerpo contra neurotensina o un fragmento del mismo que se une a neurotensina.

En una realización de la presente invención, el inhibidor de la activación por neurotensina del receptor de neurotensina de tipo 1 es un agente que regula negativamente la expresión de neurotensina en células pulmonares. Típicamente, el agente que regula negativamente la expresión de neurotensina comprende un ácido nucleico que interfiere con la expresión de neurotensina.

20 Típicamente, la regulación negativa de la expresión de NTS puede medirse por inmunohistoquímica, ensayos de unión y radioinmunoensayo o ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas para NTS (Holtom PE, *et al.* J Neurosci Methods. 100(1-2):151-6, 2000; Davis LG *et al.*, J Neurosci Methods 15-23, 1985; Vincent JP Ann N Y Acad Sci., 668:90-100,1992; Souazé F *et al.*, J Biol Chem, 272(15):10087-94, 1997).

25 Son ejemplos de estos agentes, moléculas antisentido o vectores que comprenden dichas moléculas antisentido. Las moléculas antisentido son cadenas complementarias de segmentos pequeños de ARNm. Son bien conocidos los métodos para diseñar moléculas antisentido eficaces (véase, por ejemplo, el documento US6165990), y está dentro de la capacidad del experto en la materia diseñar moléculas antisentido capaces de regular negativamente la expresión

30 de neurotensina o del receptor de neurotensina de tipo 1 en células pulmonares. Otros ejemplos son moléculas de ARN de interferencia (ARNi) tales como, por ejemplo, ARN interferentes cortos (ARNip) y ARN en horquilla cortos (ARNhp). ARNi se refiere a la introducción de un ARN bicatenario homólogo para dirigirse específicamente a un producto génico, en el presente caso neurotensina o receptor de neurotensina, dando como resultado un fenotipo nulo o hipomórfico. Se conocen bien métodos para diseñar moléculas de ARNi eficaces (como revisión, véase Hannon and Rossi Nature. 2004 Sep 16; 431(7006):371-8), y está dentro de la capacidad del experto en la materia diseñar moléculas de ARNi capaces de regular negativamente la expresión de neurotensina o de un receptor de neurotensina en células pulmonares.

40 Son ejemplos de ARNip capaces de regular negativamente la expresión de neurotensina o del receptor de neurotensina en células pulmonares moléculas de ácido nucleico que comprenden una de las siguientes secuencias:

ARNip NTSR1:

5'-AAGAAGTTCATCAGCGCCATC-3' (SEQ ID NO: 1)

45

ARNip NTS:

5'-GCAATGTTGACAATATACC-3' (SEQ ID NO: 2)

50 En una realización adicional de la invención, el inhibidor de la activación por neurotensina del receptor de neurotensina de tipo 1 es un anticuerpo contra neurotensina o un fragmento del mismo que se une a neurotensina.

El experto en la materia conocerá métodos convencionales para la producción de dicho anticuerpo específico o fragmento del mismo. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos específicos o fragmentos del mismo inmunizando a un animal con neurotensina y seleccionando los anticuerpos que inhiben la activación por neurotensina del receptor de neurotensina de tipo 1.

Típicamente, la inhibición de la activación por neurotensina del receptor de neurotensina de tipo 1 puede medirse con ensayos biológicos que estiman el nivel del segundo mensajero, o el efecto celular oncogénico, o los cambios morfológicos de las células (Skrzydelski D *et al.* Mol Pharmacol. 64(2):421-9 2003; Xu-van Opstal WY *et al.*, Microsc Res Tech. 28(5):440-7 1994; Souaze F *et al.* Can Res 66(12):6243-9 2006).

60 El experto en la materia conocerá métodos convencionales para la producción de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales y fragmentos de los mismos que se unen a NTS o NTSR1. También son bien conocidos fragmentos de anticuerpo, particularmente fragmentos Fab y otros fragmentos que conservan la capacidad de unión al epítipo y la especificidad, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos "humanizados" en los que ciertas regiones estructurales (que no determinan la especificidad por el antígeno) del anticuerpo se han reemplazado por regiones

65

analogas o similares de otras especies. De esta manera, los anticuerpos generados en ratones pueden "humanizarse" para reducir los efectos negativos que se pueden producir tras la administración a sujetos humanos. Los anticuerpos quiméricos actualmente son modalidades terapéuticas aceptadas conocidas en el mercado. Por lo tanto, la presente invención comprende el uso de anticuerpos específicos para neurotensina o NTSR1 que incluyen fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, F(ab)₂, Fab, Fv y Fd, anticuerpos quiméricos en los que una o más regiones se han reemplazado por partes homologas humanas o no humanas. El experto en la materia también sabrá que pueden prepararse fragmentos tales como, por ejemplo, fragmentos ScFv y moléculas divalentes de tipo ScFv, usando métodos recombinantes.

En el contexto de la invención, el término "tratamiento", como se usa en el presente documento, significa la inversión, alivio, inhibición del progreso de o prevención del trastorno o afección al que se aplica dicho término, o inversión, alivio, inhibición del progreso de o prevención de uno o más síntomas de un cáncer no microcítico de pulmón.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" de un inhibidor de la activación por neurotensina del receptor de neurotensina de tipo 1 se entiende una cantidad suficiente para tratar un cáncer no microcítico de pulmón, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total del inhibidor o del agente citotóxico se decidirá por el médico a cargo del caso dentro del alcance de un criterio médico razonable. El nivel de dosificación terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular que lo necesite dependerá de una diversidad de factores que incluyen el estadio del cáncer no microcítico de pulmón a tratar y la actividad del agente inhibidor/citotóxico específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el momento de administración, la vía de administración, la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o al mismo tiempo y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien conocido dentro de la experiencia en la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles menores que los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

Típicamente, los medicamentos de acuerdo con la invención comprenden un inhibidor de la activación por neurotensina del receptor de neurotensina de tipo 1, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un experto en la materia conocerá vehículos adecuados. Las formulaciones adecuadas para la administración por cualquier vía deseada pueden prepararse por métodos convencionales, por ejemplo, por referencia a un texto bien conocido tal como Remington; The Science and Practice of Pharmacy.

Un método de tratamiento de acuerdo con la invención puede usarse en combinación con cualquier otra estrategia terapéutica para tratar cáncer no microcítico de pulmón, por ejemplo, cirugía, radioterapia externa, quimioterapia o terapia hormonal o terapia con citocinas. En una realización preferida, se usa un inhibidor de la activación por neurotensina de NTSR1 en combinación con quimioterapia, es decir, en combinación con un agente anticanceroso.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente anticanceroso" o "agente quimioterapéutico" se refiere a compuestos que se usan en el tratamiento de cánceres.

Los agentes anticancerosos incluyen, pero sin limitación, un antimetabolito tal como pemetrexed, fludarabina, gemcitabina, capecitabina, metotrexato, taxol, taxotere, mercaptopurina, tioguanina, hidroxurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, etopósido, tenipósido, campotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, L-asparaginasa, doxorubicina, epimibicm, 5-fluorouracilo, taxanos tales como docetaxel y paclitaxel, leucovorina, levamisol, irinotecan, estramustina, etopósido, mostazas nitrogenadas, BCNU, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina y vinorelbina, mesilato de imatinib, hexametilmelamina, topotecán, inhibidores de quinasa, inhibidores de fosfatasa, inhibidores de ATPasa, tirfostinas, inhibidores de proteasa, inhibidores de herbimicina A, genisteína, erbstatina y lavendustina.

En una realización preferida, el agente anticanceroso se selecciona entre taxol; taxotere; complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; doxorubicina; taxanos tales como docetaxel y paclitaxel; alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina y vinorelbina; genisteína; erbstatina; un antimetabolito tal como pemetrexed; y lavendustina.

Típicamente, antes de aplicar un método de tratamiento de acuerdo con la presente invención a un sujeto que padece cáncer no microcítico de pulmón, puede realizarse un ensayo de diagnóstico para determinar si el cáncer no microcítico de pulmón presenta células que expresan NTSR1. Al realizar dicho ensayo de diagnóstico antes del tratamiento, es posible determinar si un sujeto respondería a un método de tratamiento de acuerdo con la invención. Está dentro de la capacidad del experto en la materia realizar dicho ensayo de diagnóstico. Típicamente, la expresión de NTSR1 puede medirse, por ejemplo, por RTC-PCR o inmunohistoquímica realizada en una muestra obtenida por biopsia.

Como alternativa, los niveles de neurotensina, o de un precursor de la misma, tal como proneurotensina, en una muestra obtenida de los sujetos, pueden determinarse para tratar solo los sujetos que tienen un nivel elevado de neurotensina o un precursor de la misma tal como proneurotensina. Son ejemplos de muestras obtenidas de los sujetos, una muestra de sangre entera, una muestra de plasma o una muestra de suero. La medición de neurotensina o proneurotensina también puede usarse para detectar una recurrencia eventual del tumor y/o de metástasis. Se proporcionan ejemplos del método para medir los niveles de proneurotensina en el documento WO2006/079528, en

Ernst *et al.*, Peptides 27 (2006) 1787-1793 y en Friry *et al.*, Biochemical and Biophysical research Communication 290, 1161-1168 (2002).

En una realización de la invención, el sujeto que lo necesita es un sujeto con cáncer no microcítico de pulmón en estadio I o II que presenta células que expresan NTSR1. Los estadios del cáncer de pulmón se definen, por ejemplo, en Clifton T. Mountain Chest 111;1710-1717 1997.

La presente invención también se refiere a un método para determinar el pronóstico de un sujeto que padece adenocarcinoma de pulmón, que comprende la etapa de detectar la expresión de NTSR1 en células de cáncer no microcítico de pulmón, obtenidas de dicho sujeto, donde la presencia de expresión de NTSR1 indica que el sujeto tiene un mal pronóstico.

En una realización de la invención, dicho sujeto es un sujeto con cáncer no microcítico de pulmón en estadio I o II.

La presente invención, por lo tanto, permite la evaluación del riesgo de recurrencia de un sujeto que se ha tratado quirúrgicamente.

El término "detección", como se ha usado anteriormente, incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (medición de niveles) con o sin referencia a un control. Típicamente, la expresión de NTSR1 puede medirse, por ejemplo, por RT-PCR o inmunohistoquímica realizada en una muestra obtenida por biopsia.

Un método de pronóstico de acuerdo con la invención puede usarse en combinación con cualquier otro método ya usado para la estadificación de cánceres no microcítico de pulmón (véase, por ejemplo, Clifton T. Mountain Chest 1997; 111; 1710-1717).

La divulgación también proporciona un método para predecir la respuesta al tratamiento con un agente anticanceroso en un sujeto que padece cáncer no microcítico de pulmón, que comprende la etapa de detectar la expresión de NTSR1 en células de cáncer no microcítico de pulmón, obtenidas de dicho sujeto.

La presencia de células que expresan NTSR1 indica una mala respuesta al tratamiento con el agente anticanceroso.

La presente divulgación también proporciona un método para detectar y localizar células de cáncer no microcítico de pulmón y sus metástasis en el cuerpo de un sujeto, al que previamente se le ha administrado una cantidad suficiente para obtener imágenes de un agente marcado que se une a NTSR1, que comprende la etapa de someter dicho cuerpo a la obtención de imágenes.

Los ejemplos de agentes marcados que se unen a NTSR1 pueden seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo marcado contra el receptor de neurotensina de tipo 1 o un fragmento del mismo que se une al receptor de neurotensina de tipo 1, una neurotensina marcada o un análogo de neurotensina marcado.

Está dentro de la capacidad del experto en la materia realizar dicho método de formación de imágenes. Típicamente, el marcador puede ser un fluoróforo, un isótopo radiactivo o un agente paramagnético. Son bien conocidos los análogos de neurotensina marcados y sus usos para obtener imágenes, véanse, por ejemplo, los documentos WO98/33531, WO00/78796, WO2007/093373, US6,312,661 y US5,760,188.

A continuación, la invención se ilustrará por medio de los siguientes ejemplos, así como por medio de las figuras.

Descripción de las figuras

Figura 1: Expresión de neurotensina (NTS) y del receptor de neurotensina de tipo 1 (NTSR1) en pacientes con adenocarcinomas de pulmón primarios. A) Ejemplo de inmunohistoquímica para NTSR1 (izquierda) y NTS (derecha); parte superior: marcaje positivo de pacientes con adenocarcinomas de pulmón primarios. Aumento original X100, X200 (primera línea), X400 (segunda línea), parte inferior: marcaje negativo de neumotórax idiopático X200. En todos los casos, los portaobjetos se obtuvieron con tejidos incluidos en cera de parafina. La inmunohistoquímica para NTS y NTSR1 se realizó de acuerdo con una técnica convencional que incluye una incubación de 60 minutos con el anticuerpo primario seguida de incubación con un complejo de estreptavidina-biotina-peroxidasa. B) porcentaje de pacientes positivos para NTSR1 o NTS o ambos. La positividad se evaluó por un anatomopatólogo. C) análisis de transcritos de NTS y NTSR1 en ARN procedente de pacientes con adenocarcinomas de pulmón primarios en estadio I. Se realizó PCR en una dilución 1/5 de una reacción RT que contenía 1 µg de ARN, durante 28 ciclos. Los pacientes con un punto rojo o un punto verde se consideraron positivos para NTS o NTSR1 respectivamente.

Figura 2: Se muestran curvas de supervivencia con respecto a la expresión (1) o no (2) de NTS (derecha), NTSR1 (centro), o el complejo NTS/NTSR1 (izquierda). El análisis de supervivencia se realizó de acuerdo con el método de Kaplan-Meier y la comparación se realizó por la prueba log-rank. El número de pacientes con riesgo para cada periodo de tiempo se muestra debajo de cada curva.

Figura 3: Caracterización de líneas celulares de carcinoma de pulmón, LNM35 y los clones derivados, LNM-R y LNM-F. A) Características morfológicas típicas observadas sin (calle superior) o con (calle inferior) microscopía de contraste de fase a 200 aumentos. B) Marcaje de inmunocitoquímica para tinción con vinculina (superior) actina (centro) y DAPI (inferior) de LNM-R (columna izquierda) y LNM-F (columna derecha). C) Análisis RT-PCR en 200 ng de ARN total de LNM35, LNM-R y LNM-F. D) Radioinmunoensayo de NTS realizado en medio celular de 106 células LNM-R o LNM-F cultivadas durante 24, 48 y 72 h. Los experimentos se realizaron de 3 a 5 veces por duplicado. E) Marcaje de inmunocitoquímica típico para NTSR1 de células LNM-R y LNM-F. Las células se

sembraron en un portaobjetos Sonic Seal cultivado durante 48 horas, y la inmunocitoquímica se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos.

Figura 4: Crecimiento tumoral generado por células LNM35, LNM-R y LMN-F xenoinjertadas en ratones desnudos. A) Un millón de células LNM35, LNM-R, LNM-F, o una mezcla de LNM-R y LNM-F (50/50) se inyectaron por vía subcutánea en 24, 36, 34 o 12 ratones desnudos, respectivamente. Los volúmenes tumorales se midieron cada semana. Se usó una fórmula elipsoide ($4/3 \text{ PI} \times (L/2x)l/2xh/2$) para calcular el volumen. B) Peso tumoral a los 28 días. C) Inmunohistoquímica típica para NTSR1 (izquierda) o NTS (derecha) para tumores generados a partir de células LNM-R (superior) o LNM-F (inferior). Diferencias significativas a *** $P < 0,001$ o ** $P < 0,01$ usando análisis de varianza y prueba de Student-Neuman-Keuls.

Figura 5: Se generaron líneas celulares de silenciamiento para NTS o NTSR1 (R-SI NTS y R-SI NTSR1, respectivamente) a partir de la línea celular LNM-R. A) Se transcribió de forma inversa 1 μg de ARN total de LNM35, LNM-R, LNM-F, R-SI NTSR1, y R-SI NTS. Los experimentos de PCR se realizaron usando cebadores específicos para NTS (superior) y NTSR1 (inferior). Se sometieron a electroforesis amplicones en geles de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. B) El radioinmunoensayo de NTS se realizó en un medio celular de 106 células LMN-R, R-SI NTSR1 o R-SI NTS cultivadas durante 24, 48 y 72 h. El experimento se realizó de 3 a 5 veces por duplicado. C) se inyectaron un millón de células LNM-R, R-SI NTS, R-SI NTSR1, o una mezcla 50/50 de R-SI NTS y R-SI NTSR1 en 36, 21, 21 y 19 ratones, respectivamente. Los volúmenes tumorales se midieron todas las semanas. Se usó una fórmula elipsoide ($4/3 \text{ PI} \times (L/2x)l/2xh/2$) para calcular el volumen. D) Peso tumoral a los 28 días. Diferencias significativas a *** $P < 0,001$ usando el análisis de varianza y la prueba de Student-Neuman-Keuls. E) Inmunohistoquímica típica para NTSR1 (izquierda) o NTS (derecha) para tumores generados a partir de células R-SI NTS (superior) o R-SI NTSR1 (inferior). F) Análisis de transcritos de NTS y NTSR1 en tumores de células LNM 35 R-SI NTSR1, LNM-F, LMN-R y RSI NTS. El análisis se realizó el día 28. Se muestran ejemplos de dos tumores diferentes.

Figura 6: Regulación endocrina por NTS y aumento del crecimiento tumoral. A) se inyectaron un millón de células R-SI NTS en los costados derechos de los ratones, y se inyectaron un millón de células R-SI NTSR1 en los costados izquierdos de los mismos ratones ($n=18$). En una segunda serie, se inyectaron un millón de células LNM-R sólo en los costados derechos de los ratones ($n=36$). Los volúmenes tumorales se midieron todas las semanas. Se usó la fórmula elipsoide ($4/3 \text{ PI} \times (L/2x)l/2xh/2$) para calcular el volumen. B) Peso tumoral el día 28, C) Se inyectaron un millón de células LNM35 o una mezcla 50/50 de células R-SI NTS y LNM-R o una mezcla 50/50 de células R-SI NTS y LNM-F en los costados derechos de los ratones, se inyectaron 28, 17 y 14 ratones, respectivamente. Los volúmenes tumorales se midieron cada semana. Se usó la fórmula elipsoide ($4/3 \text{ PI} \times (L/2x)l/2xh/2$) para calcular el volumen. D) Peso tumoral el día 28. Diferencias significativas a *** $P < 0,001$ y ** $p < 0,01$ usando análisis de varianza y prueba de Student-Neuman-Keuls.

Figura 7: Un mecanismo hipotético para el aumento del crecimiento tumoral por el sistema NTS. Puede producirse regulación autocrina, paracrina y endocrina de una forma aislada o combinada. La regulación autocrina o endocrina por NTS está asociada con bajo crecimiento tumoral que aumenta fuertemente por la adición de una regulación paracrina por NTS. Se sabe que NTS potencia la proliferación celular a través de varios mecanismos, incluyendo la liberación de moléculas de tipo EGF, e IL8. Una posible explicación del estímulo del crecimiento tumoral por NTS y la cooperación entre las células con una regulación autocrina por NTS y las células con regulación paracrina sería el aumento de la liberación de ligandos de tipo EGF en las proximidades de las células, causando una activación más fuerte de EGFR, conocido por su importante papel en la proliferación celular. La ausencia de expresión de NTSR1 en la superficie celular da como resultado un crecimiento tumoral muy bajo, que indica la participación de NT circulante y local en la progresión tumoral.

Figura 8: Se sembraron 5000 células en placas de 24 pocillos y se trataron con concentraciones crecientes de Cisplatino (A), Pemetrexed (B), o ambos (C). Se realizan ensayos de viabilidad de MTT después de 7 días de tratamiento. Los resultados se expresan como la relación entre la DO de células no tratadas y la DO de células tratadas a su concentración de fármaco respectiva (Media \pm DT)

Ejemplos

En la siguiente descripción, todos los experimentos de biología molecular para los que no se proporciona un protocolo detallado se realizan de acuerdo con un protocolo convencional.

Ejemplo 1

Resumen

Se evaluó retrospectivamente la asociación del receptor de neurotensina de tipo 1 (NTSR1), o la neurotensina (NTS), o ambos, y la supervivencia entre 71 pacientes con adenocarcinoma de pulmón primario en estadio I. Los tumores experimentales se desarrollaron usando una línea celular de cáncer de pulmón agresiva, que expresaba NTSR1, o NTS y NTSR1, o silenciada para ambos.

Resultados: Se encontró expresión de NTS y NTSR1 en (66 %) y (59 %) de los casos, respectivamente. La expresión de ambos se produjo en (43,6 %) de los pacientes. La expresión de NTS no tuvo ningún impacto sobre la supervivencia. El marcaje positivo de NTSR1 se asoció con un pronóstico significativamente peor que el marcaje negativo (tasa de supervivencia en 5 años del 51,7 % frente al 90,2 %; $p = 0,00027$). El tamaño tumoral de las líneas celulares que expresaban NTS y NTSR1, o NTSR1 solo, fue un 32 % y un 51 % más pequeño, respectivamente, que el de la mezcla de las dos líneas celulares. El agotamiento de NTS o NTSR1 en la línea celular que expresaba originalmente ambas moléculas va acompañado de una reducción del 35 y 60 % en el tamaño del tumor, respectivamente.

Conclusión: El complejo NTS/NTSR1 aumenta el crecimiento del tumor de pulmón. La evaluación de la expresión de NTSR1 en tumores de bajo estadio es un marcador para distinguir la agresividad de los tumores.

Métodos

Pacientes y muestras de tejidos

Se revisaron retrospectivamente archivos clínicos de 71 pacientes consecutivos tratados por lobectomía y disección nodal completa para un adenocarcinoma de pulmón primario patológico en estadio I. Todos los pacientes se operaron en el Departamento de Cirugía Torácica de Hôtel-Dieu Hospital, París, Francia, entre el 8 de enero de 2001 y el 27 de marzo de 2003. En todos los pacientes se realizó una resección completa macroscópica y microscópicamente. Ninguno se había sometido a quimioterapia o radioterapia preoperatoria o posoperatoria. Para todos los casos, se obtuvieron portaobjetos histológicos del tumor primario mediante tejidos incluidos en cera de parafina. Se usó la tinción convencional H&E para asegurar el carácter tumoral de la muestra y se obtuvieron secciones adyacentes para el análisis inmunohistoquímico.

Inmunohistoquímica

La inmunotinción de NTSR1 y NTS se realizó en secciones desparafinadas del 4 μm de espesor, usando el método del complejo avidina biotina peroxidasa. Después de la inhibición de las peroxidases endógenas con peróxido de hidrógeno al 3 %, los portaobjetos se lavaron en TBS y se incubaron con suero de conejo normal al 10 % a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. La inmunorreactividad de NTSR1 se detectó usando un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra el extremo carboxilo humano del receptor (1:100) (C-20 Santa Cruz EE.UU). La inmunorreactividad de NTS se realizó usando anticuerpo de conejo dirigido contra NTS (1/500) (NA1230 Biomol, EE.UU) durante 2 horas a TA en una cámara humidificada en el caso del tumor humano y con el fragmento largo de NTS, FL170 (Santa Cruz) a una dilución de 1/200 para los tumores xenoinjertados. La especificidad inmunohistoquímica de NTS o NTSR1 se comprobó por omisión del anticuerpo primario y desplazamiento con el péptido neutralizador (Santa Cruz, EE.UU) o NTS, durante 2 horas a TA. Todos los portaobjetos se aclararon tres veces con TBS; las secciones se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado (1:200) (Vector, EE.UU), durante 30 min a TA. El complejo antígeno-anticuerpo se reveló con complejo de avidina-biotina-peroxidasa, durante 30 minutos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el kit Vectastain ABC (Vector, EE.UU). La tinción se realizó durante 5 minutos con tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) (Sigma, EE.UU). Todos los portaobjetos se sometieron a una tinción negativa con hematoxilina. Se usó el mismo procedimiento para los tumores de ratón.

Procedimiento de cultivo

Las líneas celulares de pulmón humano NCI-H460 y LNM35 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Invitrogen, EE.UU) suplementado con suero bovino fetal al 10 % y glutamina 2 mM. La línea celular LNM35 se subclonó por dilución limitante. Después de unos pocos días de cultivo, se guardaron los clones que contenían exclusivamente células planas o redondeadas y se denominaron LNM-F en el caso de las células planas y LNM-R en el caso de las células redondeadas.

Extracción de ARN y RT-PCR

Los protocolos para la extracción de ARN total, reacción de transcripción inversa (RT) y PCR están documentados en Souza *et al.* La RT se realizó en 2 μg de ARN total usando un cebador específico de NTSR1 (5'-GCTGACGTAGAAGAG-3' SEQ ID NO: 3) o 50 pmol de oligo dT y oligo dN. La amplificación por PCR se realizó en un 1:5 v/v de la reacción RT usando 25 pmol de cada cebador 5'-CGTGGAGCTGTACAACCTTCA-3' SEQ ID NO:4 y 5'-CAGCCAGCAGACCACAAAGG-3' SEQ ID NO:5 para NTSR1, y 5'-CAGCTCCTGGAGTCTGTGCT-3' SEQ ID NO:6 y 5'-GTTGAAAAGCCCTGCTGTGACAGA -3' SEQ ID NO:7 para NTS, S: 5'-TTCAAATGAGATTGTGGAAAA-3' SEQ ID NO:8 y AS: AGATCATCTCTGCCTGAGTAT SEQ ID NO:9 para Cox-2, 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCG-3' SEQ ID NO:10 y 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGCT-3' SEQ ID NO:11 para GAPDH 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. Los ciclos de PCR se precedieron por desnaturalización a 95 °C durante 5 min y se continuaron por una extensión final a 72 °C durante 10 min. La amplificación se realizó en un termociclador de ADN 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia).

Construcción y transfección de ARNip de NTSR1 y NTS

Se prepararon ARNip para NTSR1 humano (5'-AAGAAGTTCATCAGCGCCATC-3' SEQ ID NO: 1) y NTS humana (5'-GCAATGTTGACAATATACC-3' SEQ ID NO: 2) usando psilencer 3.1-H1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ambion, EE.UU). Se transfectaron células LNM-R usando reactivo Lipofectamine (Invitrogen, EE.UU). Los transfectantes estables se seleccionaron con higromicina B (400 mg/ml) y las colonias se exploraron usando RT-PCR (Souazé F *et al.*, Cancer Res 66(12):6243-9 2006).

Inmunohistoquímica

Se cultivaron LNM35, LNM-R y LNM-F en portaobjetos Sonic Seal de 4 pocillos (Nunc). En resumen, las células se fijaron durante 2 minutos por solución de acetona/metanol (V/V) y el marcaje del receptor NTSR1 se realizó con anticuerpo policlonal (1/500) (c2206, sigma) y se reveló con anticuerpo anti-conejo FITC secundario (1/200). La polimerización de actina se detectó por incubación de los portaobjetos durante 30 minutos con faloidina conjugada con TRITC (Sigma) en PBS-BSA al 1 %. Para la inmunotinción de vinculina, los portaobjetos se incubaron durante 1 h con anticuerpo de vinculina (Sigma) 1/100 en PBS-BSA al 0,5 %. Los portaobjetos posteriormente se incubaron durante 1 h con IgG de cabra anti-ratón FITC (Immunotech, Marseille, Francia). Los portaobjetos se montaron usando el medio Vectashield-diamidino-fenilindol (DAPI, Vector, Burlingame, CA, EE.UU).

Radioinmunoensayo de NTS

Se cultivaron un millón de células en placas Petri de 60 mm, después de 24 horas se retiró el medio y se añadió medio sin suero a las células durante 24, 48 o 72 h. Se recogió el medio; se centrifugó 5 min a 2000 g, y se añadieron 5000 UIK/ml de trasylol al medio. El radioinmunoensayo se realizó en 1 ml de medio liofilizado de acuerdo con el procedimiento desarrollado en Scarceriaux *et al.* (Scarceriaux V *et al.* Endocrinology; 136(6):2554-60, 1995). En resumen, se incubaron diluciones seriadas de NTS (Sigma) o muestras desconocidas en 1 ml de tampón de ensayo final (NaH₂PO₄ 60 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4) con el anticuerpo anti-NTS (dilución final 1/33 300) A44 (Euro Diagnostica), y [¹²⁵I]tyr]-NTS 5000 dpm; 2000 Ci/mmol a 4 °C durante 5 días. Se separó la [¹²⁵I]tyr]-NTS unida del radioligando libre por precipitación con polietilenglicol al 16 % y 5 mg/ml de gammaglobulina de conejo. Después de una centrifugación (2.500 X g durante 20 min), se midió la radiactividad que quedaba en el sedimento en un contador gamma (Wallac modelo 1470 Wizard).

Animales

Los xenoinjertos se iniciaron por inyección subcutánea de LNM35, o LNM-F, LNM-R o R-SI NTS o R-SI NTSR1. Las células se descongelaron a partir de N₂ líquido; se cultivaron en medios apropiados, y se dividieron de 2 a 5 veces antes de cultivarse a la concentración de 10⁶ células en un matraz T75. Después de 72 h, las células se tripsinizaron, se contaron dos veces usando células de recuento Neubauer y se resuspendieron en PBS a la concentración de 10⁶ células/100 µl. Se inyectaron 100 µl por animal. Se usó un mínimo de 6 animales por grupo. Para generar tumores a partir de la mezcla de células, las células se cultivaron conjuntamente en un matraz T150 a 10⁶ células de cada clon (LNM-R y LNM-F, o R-SI NTS y R SI NTSR1). Las mezclas de células se cultivaron durante 72 h antes de la tripsinización. Se inyectaron 100 µl de PBS que contenía 10⁶ células por animal. Un grupo de animales se inyectó en el costado derecho con 10⁶ células R-SI NTS y en el costado izquierdo con 10⁶ células R-SI NTSR1. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula elipsoide ((4/3xpl x (longitud/2) x (anchura/2 x (altura/2)). Los ratones se sacrificaron después de 28 días, y los tumores se diseccionaron y se pesaron. La parte del tumor se congeló inmediatamente en N₂ líquido y una parte se fijó en paraformaldehído al 4 %. Se realizaron bloques de parafina y se realizaron cortes de XX µm.

Análisis estadístico

Se usó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls para determinar la variación entre el volumen y el peso entre tumores de diversos orígenes de líneas celulares. La supervivencia se calculó por el método de Kaplan-Meyer y la comparación de las curvas de supervivencia se realizó mediante la prueba log-rank.

Resultados:

Expresión de NTS y NTSR1 en adenocarcinomas de pulmón humano

La expresión de NTS y NTSR1 se estudió por inmunohistoquímica en una serie de 71 pacientes consecutivos sometidos a lobectomía pulmonar y disección nodal para adenocarcinomas de pulmón patológicos en estadio I. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes. Se estudiaron 71 pacientes consecutivos tratados por lobectomía para adenocarcinoma pulmonar primario patológico en estadio I. Ninguno se había sometido a quimioterapia o radioterapia perioperatoria.

Adenocarcinomas pulmonares n=71	
Edad	59,6 ± 10,7
Hombres	59/71
T1	28/71
Enfermedades T2	43/71
Tamaño tumoral (cm) [media ± DT]	3,8 ± 2,07
N0	71/71
Émbolos vasculares neoplásicos intratumorales o peritumorales	24/71
Émbolos linfáticos neoplásicos intratumorales o peritumorales	15/71
Tumores positivos para NTSR1 [n (% de pacientes)]	45/71 (63 %)
Tumores positivos para NTS [n (% de pacientes)]	46/71 (65 %)
Tumores positivos para NTSR1 y NTS [n (% de pacientes)]	31/71 (44 %)
Pérdidas de seguimiento	1/71
Seguimiento en meses [media ± DT]	48,2±20,9
Muertes durante el seguimiento [n (% de pacientes)]	22/70 (31 %)
Terapias perioperatorias	
Radioterapia [n]	0/71
Quimioterapia [n]	0/71
Neumotórax idiopático n=26	
Parénquima pulmonar positivo para NTSR1	0/26
Parénquima pulmonar positivo para NTS	0/26
Parénquima pulmonar positivo para NTSR1 y NTS	0/26
n= número de pacientes, DT = desviación típica	

La tinción de NTSR1 en las células cancerosas era granular, restringiéndose la tinción principalmente al citoplasma, y en raras ocasiones a la superficie celular, como se muestra en la Figura 1A a la izquierda. El marcaje de NTS con frecuencia era muy intenso y siempre estaba distribuido en todo el citosol. En la mayoría de los casos, todas las células cancerosas se marcaron con NTS, mientras que el estroma del tumor era negativo. En la Figura 1A a la derecha se muestra una imagen típica de la inmunotinción de NTS observada. Todas las muestras se evaluaron por un anatomopatólogo. Se encontró expresión de NTS y NTSR1 en 46/71 (66 %) y 45/71 (59 %) de los casos, respectivamente. La expresión de NTS y NTSR1 se produjo en 31/71 (43,6 %) de los pacientes (Figura 1B). Se encontraron resultados similares cuando se estudiaron los transcritos de NTS y NTSR1, 15/23 (65 %) pacientes expresaron NTS (puntos rojos en la Figura 1C) y 16/23 (69 %) expresaron NTSR1 (puntos verdes en la Figura 1C). Diez pacientes de 23 (43 %) expresaron los dos marcadores.

La expresión de NTS como se evalúa por inmunohistoquímica no tuvo ningún impacto sobre la supervivencia (Figura 2, izquierda), mientras que la expresión de NTSR1 estaba asociada con un pronóstico significativamente peor que la ausencia de expresión de NTSR1 (tasa de supervivencia en 5 años del 51,7% frente al 90,2 %; p = 0,00027) (Figura 2 central). Los pacientes con tumores que expresaban los dos marcadores también tuvieron un pronóstico significativamente peor que los que tenían tumores que expresaban solo NTS o solo NTSR1 o ninguno de ellos (tasa de supervivencia en 5 años del 49,5 % frente al 78,5 %; p = 0,018, Figura 2 derecha).

Este resultado suscita la cuestión de si la expresión de NTSR1 en pacientes con un peor resultado es solo un marcador del pronóstico porque su expresión estaría correlacionada con otros acontecimientos moleculares o asociada con la progresión del tumor o si NTSR1 también es un actor y participa potenciando la progresión del tumor. Para responder a esta cuestión se usaron tumores experimentales.

Caracterización de modelos celulares

Las células LNM35 se obtuvieron originalmente de un carcinoma de células grandes de pulmón humano, las células NCI-H460. Se ha demostrado que LNM35 produce metástasis en ganglios linfáticos regionales con una incidencia del 100 % como resultado de una implantación subcutánea convencional. La observación microscópica de la línea celular LNM35 revela dos subpoblaciones morfológicas diferentes de células (Figura 3A, panel derecho). Una población se caracteriza por un aspecto convexo y redondeado, denominada LNM-R, (Figura 3A, central). La otra población está aplanada y más extendida, LNM-F. Cada población se subclonó por dilución limitante. De acuerdo con la discrepancia morfológica de los dos subclones, la inmunocitoquímica de vinculina y actina revela distintos perfiles de proteínas. En las células LNM-R, se redujo el marcaje de actina y vinculina en comparación con las células LNM-F (Figura 3B). En las células LNM-F, el marcaje con vinculina se concentró en focos, que se sabe que aumentan la adhesión y la extensión al promover el reclutamiento de proteínas del citoesqueleto en el complejo de adhesión focal. De la misma forma, el marcaje de actina confirmó la disimilitud en la extensión celular y mostró una diferencia aparente de tamaños dentro de los dos subclones.

El análisis de transcritos demostró que los dos subclones expresan NTSR1, pero solo LNM-R expresaba NTS (Figura 3C). Se confirmó la expresión diferencial de NTS en los dos subclones por RIA. El medio de cultivo de células LNM-R contenía grandes cantidades de NTS que se acumulaban con el tiempo, mientras que el medio de las células LNM-F contenía 20 veces menos NTS (Figura 3D). El examen por inmunocitoquímica de NTS de los dos subtipos celulares se mantuvo negativo, lo que sugería que la mayoría de la NTS se liberaba en el medio (datos no mostrados). Se confirmó la regulación autocrina en células LNM-R con un experimento de inmunocitoquímica de NTSR1 (Figura 3E). En las células LNM-F, NTSR1 se localiza en la superficie celular, lo que demuestra el estado virgen de las células. Por el contrario, en las células LNM-R, NTSR1 está localizado en un área perinuclear, lo que sugiere una internalización intensa del receptor. Para confirmar que los dos tipos celulares tenían el mismo origen, se realizó un análisis microsatélite usando D17S250 y D17S513, y mostró patrones idénticos para LNM-R, LNM-F y LNM35, confirmando la derivación de LNM35 de los dos clones.

El complejo NTS-NTSR1 potencia el crecimiento tumoral

En primer lugar, se comparó la tasa de crecimiento tumoral de LNM35 y los dos subclones derivados, LNM-R (NTS+) y LNM-F (NTS-). Como se muestra en la Figura 3A, LNM35 presentaba el perfil de tumorigénesis más drástico con un volumen tumoral final de 3802 mm³. Los subclones LNM-R y LNM-F generaron tumores más pequeños con un volumen final de 2582 y 1858 mm³, respectivamente. El tamaño tumoral es un 32 % y 51 % más pequeño que LNM35 cuando se generó por LNM-R o LNM-F, respectivamente. La diferencia en la tasa de crecimiento tumoral entre las células parentales y los dos subclones sugería una cooperación entre las dos poblaciones celulares que aumenta el potencial tumoral de las células. Para confirmar esta hipótesis, se mezclaron los dos subclones a igual concentración en el matraz de cultivo antes de inyectar la mezcla en los ratones. Se observó la misma tasa de crecimiento tumoral que la generada por células LNM35, con un volumen final de 3782 mm³ para la mezcla de LNM-F y LNM-R y 3802 mm³ para LNM35 (Figura 4A). El peso tumoral observado 28 días después de la inyección siguió la misma variación que el volumen tumoral (Figura 3B). Se realizó inmunohistoquímica de NTS y NTSR1 sobre los tumores. Se observó la presencia de NTSR1 en tumores tanto LNM-R como LNM-F (Figura 4C), el marcaje es granular con intensidad irregular como la observada en el tejido humano (mostrado en la Figura 1A). Para visualizar NTS, se usó un anticuerpo contra un precursor de NTS. Solo en estas condiciones, NTS era detectable en los tumores LNM-R, pero no en los tumores LNM-F (Figura 4C).

Para evaluar el papel del complejo NTS-NTSR1 en el aumento del crecimiento tumoral, se generaron líneas celulares de silenciamiento para NTS o NTSR1 a partir de células LNM-R. En el clon R-SI NTS, el transcrito para NTS está completamente agotado. Se confirmó este resultado por RIA de NTS realizado en el medio de cultivo celular, y como era de esperar no se detectó NTS (Figura 5A y B). El análisis de transcritos demostró que en R-SI NTS, el transcrito de NTS-1 es similar al de las células LNM35 y LNM-R. En el clon R-SI NTSR1, el transcrito para NTSR1 está casi agotado, mientras que el transcrito de NTS es similar a los encontrados en las células LNM35 y LNM-R (se muestra un ejemplo en la Figura 5A).

Usando estos modelos celulares, se examinó el efecto del agotamiento de NTS o NTSR1 sobre el crecimiento tumoral de células LNM-R y sus homologas de silenciamiento de NTS y NTSR1. El agotamiento de NTS o NTSR1 en las células va acompañado por una reducción del 35 y 60 % respectivamente del volumen tumoral en comparación con el tumor LNM-R (Figura 5C). Se observó una reducción similar en el peso tumoral (Figura 5D). Se cultivó durante 3 días una mezcla de los dos clones silenciados, a igual concentración, antes de la inyección en los ratones. El volumen y peso tumorales finales fueron similares al volumen tumoral de LNM-R (Figura 5C y D). Esta observación sugiere que se produjo una cooperación entre las dos líneas celulares R-SI NTS y R-SI NTSR1 y que estimula el crecimiento tumoral (Figura 5C), y la regulación paracrina por NTS es uno de los actores principales de esta cooperación. Se verificó que los transgenes de NTS y NTSR1 seguían siendo eficaces después de 28 días de crecimiento tumoral; por inmunohistoquímica, no fue detectable el marcaje de NTS y NTSR1 en R-SI NTS y R-SI NTSR1 respectivamente (Figura 5E). Sin embargo, el análisis de transcritos muestra una mayor expresión de NTS y NTSR1 en el ARN tumoral en comparación con la línea celular original (compárense las Figuras 5F y 5A).

Para explorar el efecto de la regulación endocrina por NTS sobre el aumento del crecimiento tumoral, se inyectaron células R-SI NTS en el costado derecho y células R-SI NTSR1 en el costado izquierdo de los ratones. La Figura 6 demuestra que las células R-SI NTS alcanzan el tamaño y el peso de las células parentales, LNM-R, mientras que el tumor R-SI NTSR1 sigue teniendo el mismo tamaño pequeño que se observó en los ratones que llevaban el R-SI NTSR1 solo (compárense la Figura 6 y la Figura 5C). Los presentes inventores sugieren que la NTS circulante producida por el tumor SI-NTSR1 aumentaba el crecimiento tumoral de R-SI NTS xenoinjertado en el otro costado. Desafortunadamente, la cantidad de sangre que puede obtenerse de ratones desnudos es demasiado pequeña para realizar un RIA de NTS. La cooperación entre las dos líneas celulares para aumentar el crecimiento tumoral está mediada por factores endocrinos. Este experimento sugería que NTS controla la cooperación y el aumento del crecimiento del tumor.

A continuación, se trató la cuestión de la potencia de la regulación autocrina por NTS en comparación con la regulación paracrina. Se inyectó en ratones una mezcla de células R-SI-NTS y LNM-R a igual concentración. Esta mezcla presentaba regulación autocrina y paracrina por NTS. Después de 28 días de crecimiento, el tamaño del tumor generado por esta mezcla era similar al de los tumores generados por las células LNM35 parentales, 4122 mm³ en

comparación con 3885 mm³, respectivamente. A los 28 días, el peso tumoral de LNM35 y la mezcla de R-SI-NTS y LNM-R es similar (Figura 6D), lo que demuestra que la regulación autocrina de NTS generaba acontecimientos celulares que participan con la regulación paracrina para aumentar claramente la progresión tumoral. Por el contrario, cuando se inyectaba una mezcla de células que no expresaban NTS, R-SI NTS y LNM-F, el volumen tumoral y el peso tumoral eran un 39 % y 45 %, respectivamente, más pequeños que las células LNM 35. El tamaño y el peso tumoral eran similares a los de R-SI NTS o LNM-F cuando se inyectaban solos (1970, 1858 mm³, respectivamente) en comparación con los 2493 mm³ observados en el caso de la mezcla. Se realizaron observaciones idénticas para el peso tumoral. Cuando las células no secretan NTS, no hay cooperación entre las células, y el crecimiento tumoral sigue siendo pequeño. El experimento global sugirió que NTS participa aumentando el crecimiento tumoral y, por consiguiente, la gravedad de la progresión tumoral.

EJEMPLO 2

La expresión de NT-NTSR1 en células de cáncer de pulmón está correlacionada con la resistencia a la quimioterapia

Las células LNM R forman una subpoblación celular de la línea celular altamente agresiva LNM35. Esta línea celular presenta expresión de NTS y NTSR1. La inmunohistoquímica de NTSR1 de células LNM R muestra una acumulación del receptor en el citosol y en el compartimento perinuclear, que indica la endocitosis de NTSR1 tras la estimulación por NTS. Se generaron líneas celulares silenciadas para NTS (R SI-NTS) o NTSR1 (R SI-NTSR1) a partir de LNM R. En el siguiente experimento se estudió la respuesta de las células y los clones silenciados al tratamiento de quimioterapia propuesto actualmente para los pacientes con cáncer de pulmón avanzado. Se sembraron 5000 células en placas de 24 pocillos y se trataron con concentraciones crecientes de cisplatino (Figura 8A), Pemetrexed (Figura 8B), o ambos (Figura 8C). El ensayo de viabilidad de MTT se realiza después de 7 días de tratamiento. Los resultados se expresan como la relación de la DO de las células no tratadas con respecto a la DO de células tratadas a su concentración de fármaco respectiva.

En estos experimentos, la regulación autocrina por NTS se asoció con una respuesta débil a los agentes quimioterapéuticos incluso a una concentración muy elevada, mientras que en ausencia de regulación por NTS, la anulación de la expresión de NTS o NTSR1 da lugar a que la célula responda a los agentes quimioterapéuticos. Las respuestas iniciales se observan a bajas concentraciones (2,5 microM).

Estos resultados confirman la hipótesis de que NTSR1 es un marcador predictivo eficaz de la respuesta a los tratamientos de quimioterapia para pacientes con cáncer no microcítico de pulmón.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
- <120> Métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la estadificación del cáncer no microcítico de pulmón
- <130> BEP080080
- <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> ARNip
- <400> 1
aagaagtcca tcagcgccat c 21
- <210> 2
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> ARNip

ES 2 584 932 T3

	<400> 2 gcaatgttga caatatacc	19
5	<210> 3 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
15	<400> 3 gctgacgtag aagag	15
20	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
25	<400> 4 cgtggagctg tacaactca	20
30	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 5 20 cagccagcag accacaaagg	20
40	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 6 20 cagctcctgg agtctgtgct	20
50	<210> 7 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 7 gttgaaaagc cctgctgtga caga	24
60	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador	

ES 2 584 932 T3

	<400> 8 ttcaaatgag attgtgaaa a	21
5	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
15	<400> 9 agatcatctc tgcctgagta t	21
20	<210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
25	<400> 10 cggagtcaac ggattggtc g	21
30	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
35	<400> 11 ttcaccacca tggagaaggc t	21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar el pronóstico de un sujeto que padece adenocarcinoma de pulmón, que comprende la etapa de detectar la expresión del receptor de neurotensina de tipo 1 (NTSR1) en células de cáncer no microcítico de pulmón obtenidas de dicho sujeto, en el que la presencia de expresión de NTSR1 indica que el sujeto tiene un mal pronóstico.
- 10 2. Un inhibidor de la activación por neurotensina de NTSR1 para su uso en el tratamiento de adenocarcinoma de pulmón, donde dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en un agente que regula negativamente la expresión de neurotensina, un anticuerpo contra neurotensina y un fragmento del mismo que se une a neurotensina.
- 15 3. El inhibidor de la activación por neurotensina de NTSR1 para su uso en la reivindicación 2, donde dicho inhibidor de la activación por neurotensina de NTSR1 es un agente que regula negativamente la expresión de neurotensina.
- 20 4. El inhibidor de la activación por neurotensina de NTSR1 para su uso en la reivindicación 2, donde dicho inhibidor de la activación por neurotensina de NTSR1 es un anticuerpo contra neurotensina o un fragmento del mismo que se une a neurotensina.
5. Un inhibidor de la activación por neurotensina de NTSR1 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde dicho inhibidor se usa en combinación con un agente anticanceroso.

Figura 1

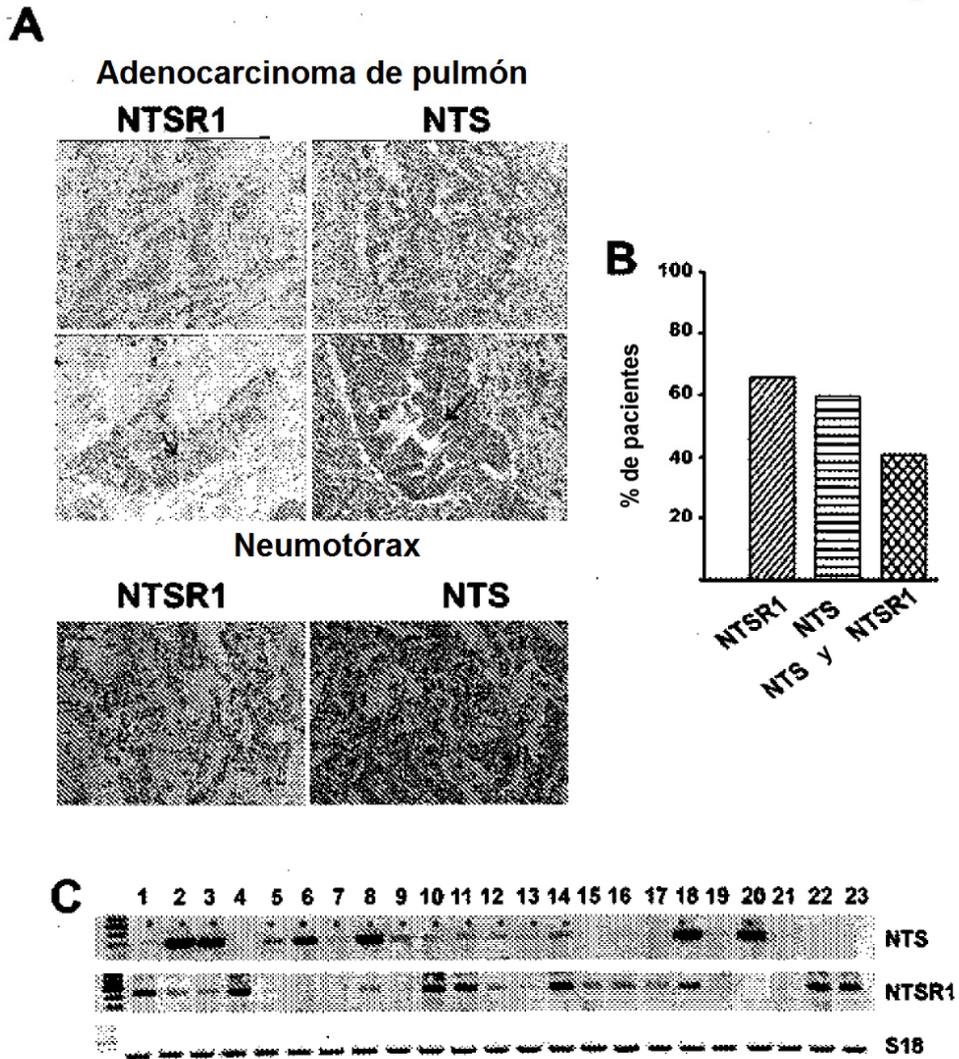


Figura 2

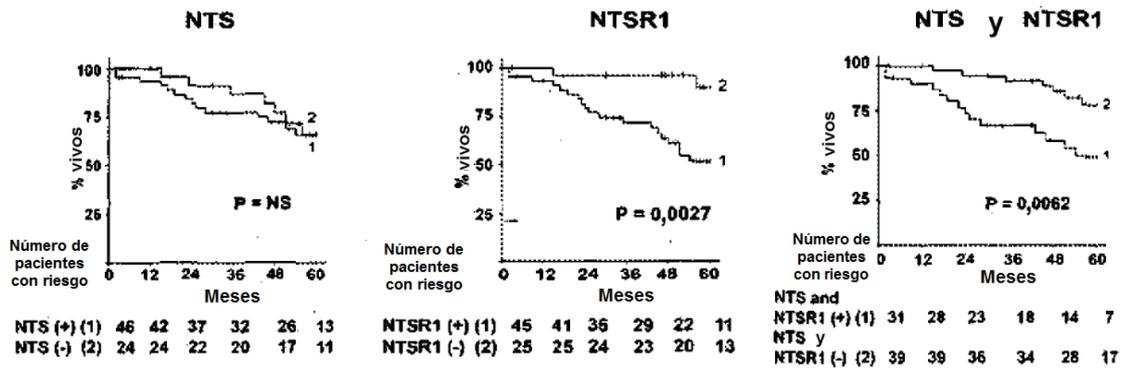


Figura 3

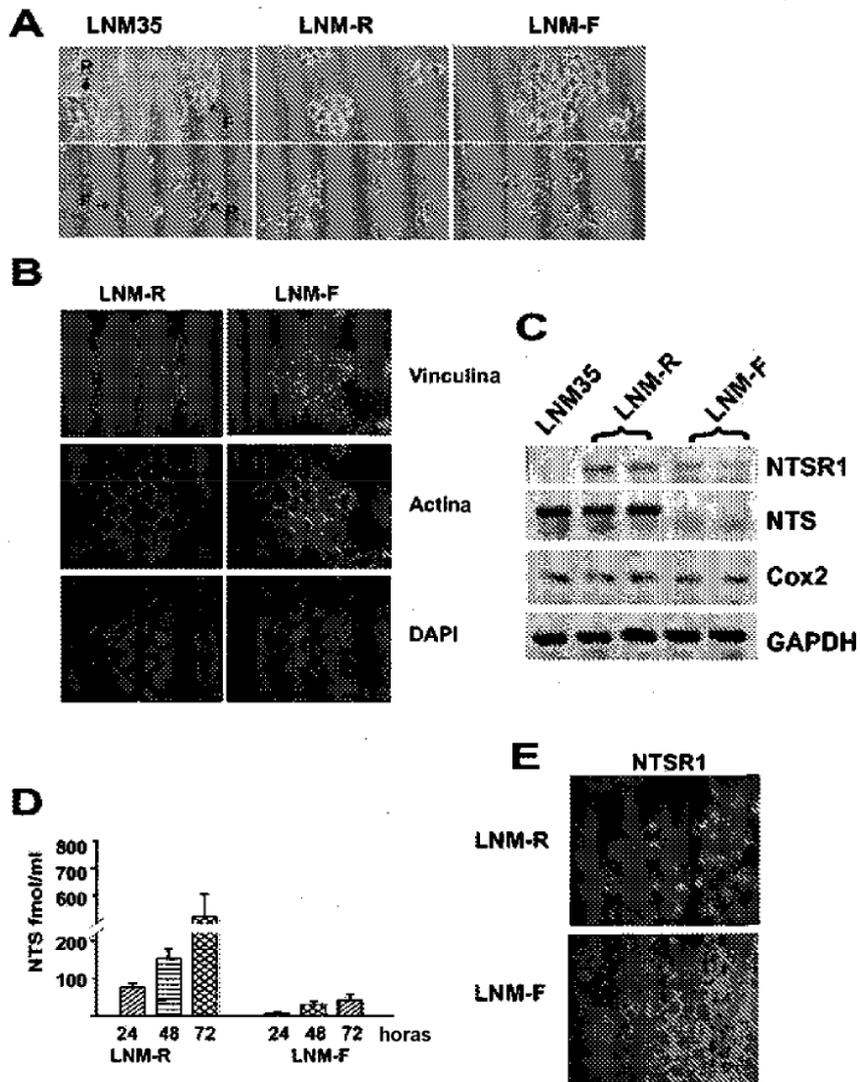


Figura 4

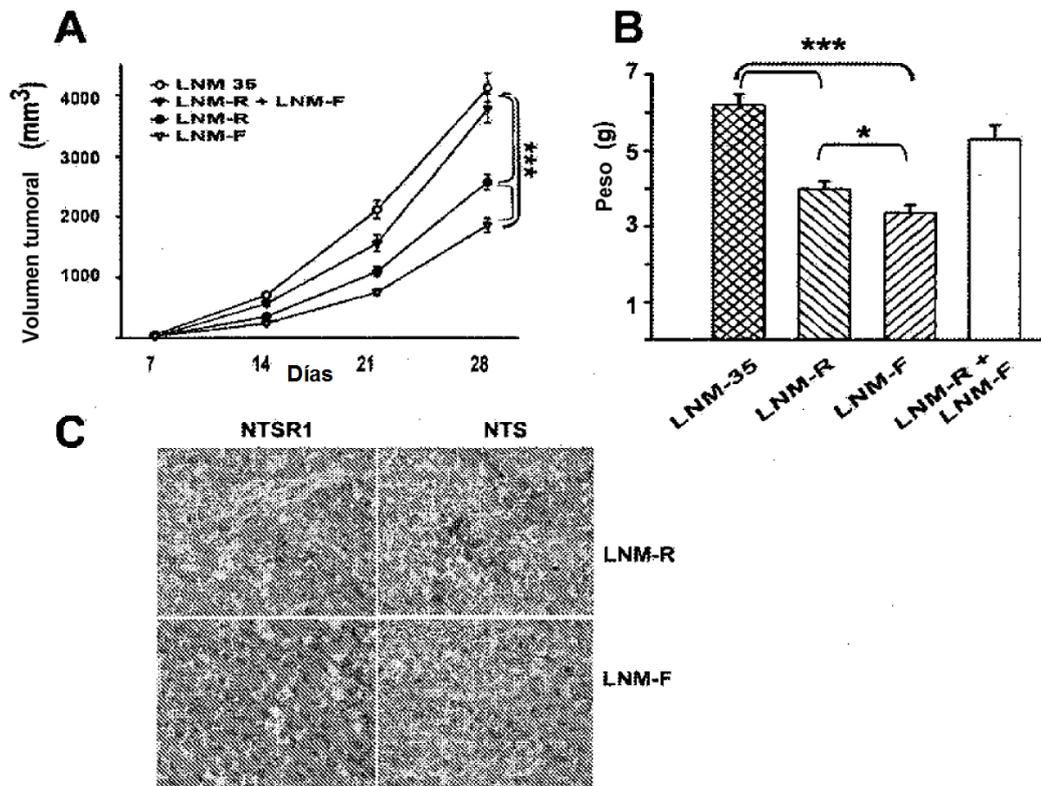


Figura 5

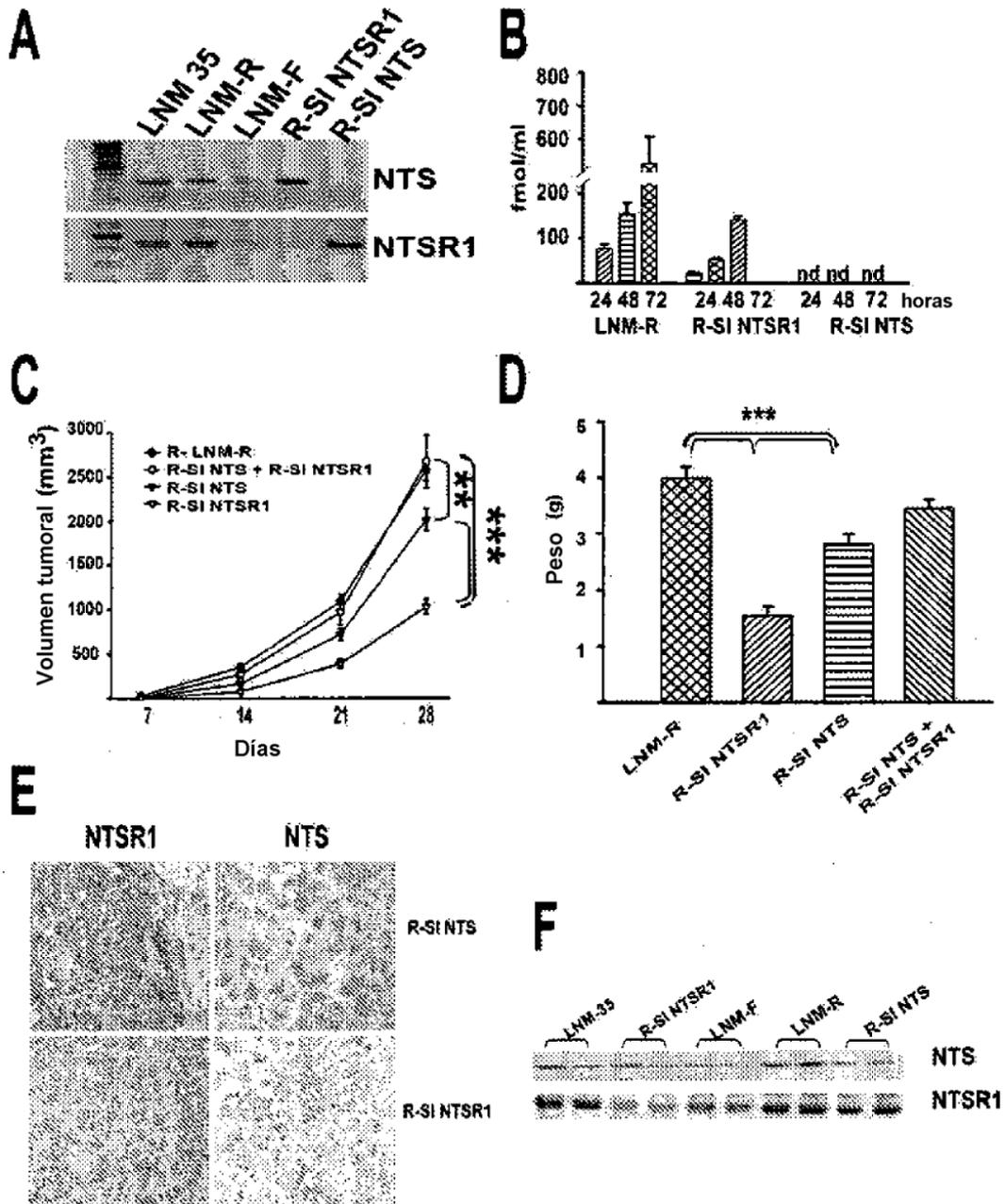


Figura 6

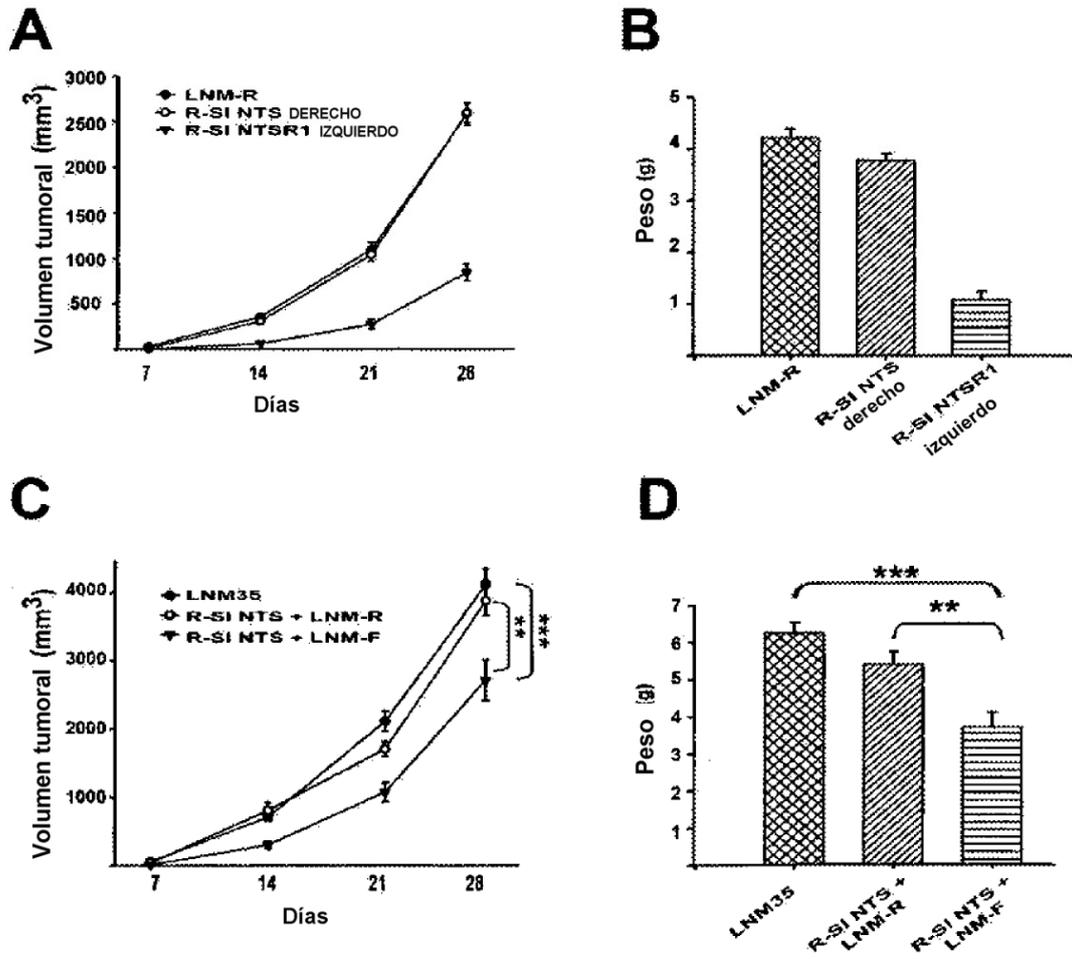


Figura 7

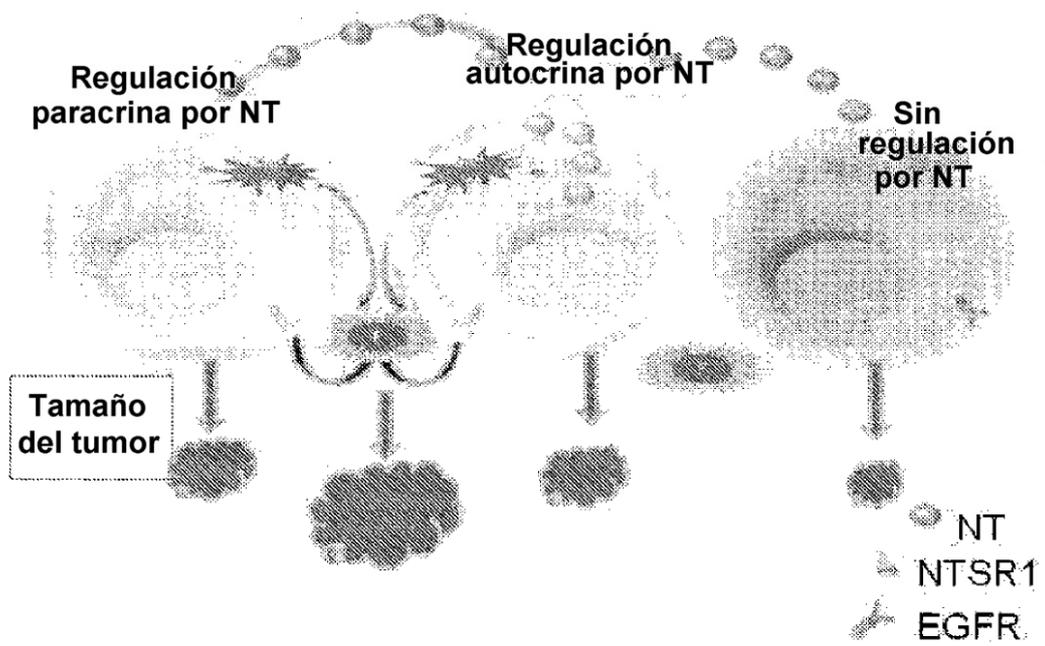
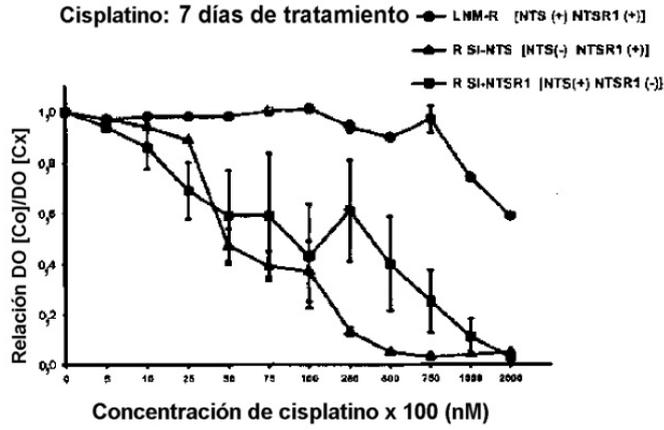
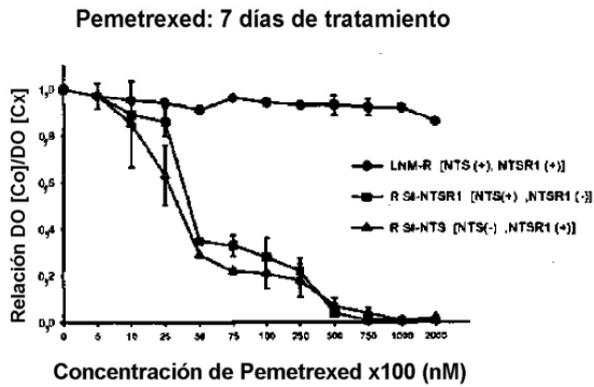


Figura 8

A



B



C

