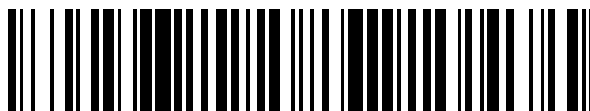


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 038**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/EP2013/054800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13710342 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2823313**

54 Título: **Método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en mujeres**

30 Prioridad:

**08.03.2012 EP 12158679**  
**08.03.2012 US 201261608346 P**  
**20.04.2012 EP 12165054**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.04.2020**

73 Titular/es:

**SPHINGOTEC GMBH (100.0%)**  
**Neuendorfstrasse 15a**  
**16761 Hennigsdorf, DE**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS y**  
**MELANDER, OLLE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 752 038 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**

Método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en mujeres

**Campo de la invención**

5 El objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de contraer cáncer en mujeres que no padecen cáncer que comprende:

• determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o pro-neurotensina 1-117 que comprende péptidos mediante un inmunoensayo o determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido a partir de dicha mujer; y

10 • correlacionar dicho nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos o pro-neurotensina 1-117 que comprende péptidos con el riesgo de contraer cáncer, donde un nivel elevado es predictivo de un mayor riesgo de contraer cáncer, y

donde dicho cáncer es un cáncer de mama, y

donde dicha pro-neurotensina 1-117 es un péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 5, y

15 donde dichos péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se seleccionan de un grupo de péptidos que comprenden las secuencias de péptidos de SEQ ID NO: 1, 2, 6 y 7,

y, donde el fluido corporal se toma de una mujer en ayunas.

20 La neurotensina es un neuropéptido de 13 aminoácidos, derivado del precursor pro-neurotensina y liberado estequiométricamente junto con el péptido estable de 117 aminoácidos pro-neurotensina (P-NT) y la hormona madura se une a tres receptores diferentes, los receptor 1 y 2 de neurotensina (Ntsr1 y Ntsr2), que son receptores acoplados a proteínas G y receptor de neurotensina 3 (Ntsr3) que no están acoplados a proteínas G y que también son conocidos como Sortilin-1 (SORT1).

25 La neurotensina se libera periféricamente desde el intestino delgado, así como centralmente desde el hipotálamo. La secreción periférica de la neurotensina es estimulada por la ingesta de alimentos, especialmente por la grasa, y se sabe que regula la motilidad gastrointestinal y la secreción pancreática y biliar. Curiosamente, la neurotensina está implicada en el control del apetito como una hormona anoréxica, ya que reduce de forma aguda la ingesta de alimentos después de la inyección central (intracerebro ventricular) y periférica (intraperitoneal) en ratas, un efecto que parece mediado principalmente a través del receptor de neurotensina-1 (Ntsr1). En obesos, en comparación con sujetos humanos de peso normal, la concentración de neurotensina plasmática posprandial se reduce después de la ingesta de comidas grasas líquidas (Widen et al 1992, Reg peptides; "Plasma concentrations of regulatory peptides in obesity following modified sham feeding (MSF) and a liquid test meal"), lo que sugiere que la regulación de la secreción de neurotensina está alterada en la obesidad. Sin embargo, ningún gran estudio ha investigado si la neurotensina está relacionada con las medidas de obesidad y de qué manera. Curiosamente, P-NT aumenta significativamente después de colocar un bypass gástrico (Roux-en-Y), una operación que ha demostrado conducir a la normoglucemia en la mayoría de los pacientes obesos con diabetes tipo 2, pero no se sabe si la neurotensina está implicada en el desarrollo de la diabetes mellitus en general. Además, el sistema de neurotensina se ha implicado en el desarrollo de la enfermedad de la arteria coronaria y el infarto de miocardio, ya que la variación del gen Ntsr3 (SORT1) es uno de los genes de susceptibilidad más fuerte frente a enfermedades de la arteria coronaria conocidos en humanos.

40 El vínculo mecanicista entre la obesidad y el cáncer es en gran parte desconocido, sin embargo, una de las teorías dominantes es que el exceso de depósitos de grasa conduce a una mayor aromatización periférica de los andrógenos y, por lo tanto, a niveles elevados de estrógenos circulantes. Además, se ha demostrado que una de las características de la obesidad, la hiperinsulinemia, inhibe la producción hepática de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), aumentando así los niveles biodisponibles de estrógenos y andrógenos, lo que sugiere formas en que la obesidad puede aumentar el riesgo de formas comunes de formas de cáncer impulsadas por las hormonas sexuales, como el cáncer de mama y de próstata. Curiosamente, tanto la presencia de neurotensina como la expresión de Ntsr1 son comunes en los tumores malignos de cáncer de mama ductal y el bloqueo farmacológico experimental o el silenciamiento de ARN del NTSR1 reduce el crecimiento tumoral en ratones.

50 El nivel de expresión del receptor 1 de neurotensina (NTSR1) en células de cáncer de mama se ha utilizado para determinar el pronóstico de un sujeto que padece cáncer de mama (documento US 2011/0305633). Además, los mismos autores afirman que no se ha descrito una correlación clara entre la neurotensina circulante y estadíos de tumores en páncreas, próstata o tiroides medular, probablemente debido a la rápida eliminación de ésta por el hígado. Curiosamente, se ha encontrado que en una serie de 51 pacientes con cáncer de mama ductal invasivo, el 91% de todos los tumores fueron positivos para el receptor 1 de neurotensina (NTSR1), pero solo el 31% de todos los tumores fueron positivos para la neurotensina en dicho tejido (Souaze et al., Cancer Research (2006), 66: (12) páginas 6243-6249).

- Existen algunas evidencias de que los receptores de neurotensina, y de que la propia neurotensina, participan en el crecimiento del cáncer, en particular en el cáncer de pulmón, cáncer de páncreas y cáncer de colon (Carraway et al, Peptides (2006), 27, 2445-2460). Se ha mostrado que los niveles de NT en suero de pacientes con cáncer de páncreas aumentaron significativamente (Picheon et al. Anticancer Research (1999), 19 1445-50). Curiosamente, este grupo descubrió que los niveles de NT disminuían con la progresión de la enfermedad tanto para el cáncer de próstata como para el cáncer de páncreas. En comparación con esto, Meggiato et al (Tumori (1996), 82; 592-5) encontraron que los niveles plasmáticos de NT eran normales en el cáncer de páncreas pero elevados en el caso de que se diagnosticara una pancreatitis.
- Belting et al, Cancer, Epidemiology, Biomarkes & Prevention, han mostrado el uso de péptidos vasoactivos para la predicción de riesgos de cáncer en hombres. MR-pro-ANP, MR-pro-ADM y copeptina se midieron en el plasma en ayunas de participantes del Estudio de dieta y cáncer de Malmö, sin cáncer antes del examen de referencia en 1991 a 1994 (1768 hombres y 2293 mujeres). Los autores declararon que entre las mujeres, no se encontraba ninguna relación entre los biomarcadores y la incidencia de cáncer.
- El documento WO 2010/079158 A1 describe métodos para el tratamiento, la evaluación pronóstica y la detección del cáncer de mama.
- Carraway, R.E., y Plona, A.M. (Peptides 27 (2006) 2445 a 2460) describe la participación de la neurotensina en el crecimiento del cáncer: mecanismos de evidencia y desarrollo de herramientas de diagnóstico.
- Ernst, A., et al. : Peptides, vol. 27, núm. 7, julio de 2006, páginas 1787 a 1793, describen que la pro-neurotensina 1 a 117 es un fragmento precursor de neurotensina estable identificado en la circulación humana.
- Un objeto de la presente invención fue investigar el poder pronóstico de NT para la predicción de la incidencia del cáncer y la predicción del riesgo de recurrencia del cáncer. Para abordar este problema, se midieron fragmentos estables de pro-neurotensina en plasma en ayunas en dicho estudio de cohorte prospectivo sueco (Malmö Diet and Cancer Study) y el nivel de referencia relacionado de este biomarcador con la incidencia del cáncer de mama durante 15 años de seguimiento.
- Sorprendentemente, se ha demostrado que la neurotensina es un biomarcador potente y altamente significativo para la mujer que predice el riesgo de contraer cáncer en mujeres que no padecen cáncer.
- Por lo tanto, el objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de contraer cáncer en mujeres que no padecen cáncer que comprende:
- determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 mediante un inmunoensayo o determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicha mujer; y
  - correlacionar dicho nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 con el riesgo de contraer cáncer, donde un nivel elevado es predictivo de un mayor riesgo de contraer cáncer, y
- donde dicho cáncer es un cáncer de mama, y
- donde dicha pro-neurotensina 1-117 es un péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 5, y
- donde dichos péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se seleccionan de un grupo de péptidos que comprenden las secuencias de péptidos de SEQ ID NO: 1, 2, 6 y 7,
- y, donde el fluido corporal se toma de una mujer en ayunas.
- El nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicha mujer, que es predictivo del riesgo de contraer cáncer en dicha mujer que no sufre de cáncer, se libera del intestino delgado. Es posible que no se libere de las células cancerosas ya que dicha mujer no padece cáncer. La liberación de neurotensina del intestino delgado es estimulada por la ingesta de alimentos, especialmente por la grasa, y se sabe que regula la motilidad gastrointestinal y la secreción pancreática y biliar. La pro-neurotensina 1-117 y sus fragmentos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se usan como marcadores sustitutos de la neurotensina liberada según la neurotensina y pro-neurotensina 1-117 y sus fragmentos o los péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se liberan en cantidades equimolares de pro-neurotensina.
- El sorprendente hallazgo de la presente invención es que la secreción periférica de neurotensina/pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117, según se define en las reivindicaciones, es indicativa de la susceptibilidad de una mujer a adquirir un cáncer. Por lo tanto, las medidas dietéticas como la reducción de esa ingesta pueden reducir dicho riesgo en dicha mujer. Se sabe por la bibliografía que la neurotensina y el receptor de neurotensina se sobreexpresan en el tejido del cáncer que se selecciona del grupo que comprende cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas y cáncer de colon.

5 Por lo tanto, los niveles elevados de neurotensina/pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en fluidos corporales, como se define en las reivindicaciones, aumentan el riesgo de contraer cáncer donde la neurotensina y/o pro-neurotensina desempeña un papel, en cánceres donde el receptor de neurotensina se sobreexpresa en dichas células cancerosas, p. ej. en el cáncer de mama. Por lo tanto, el objeto de la presente invención es la determinación de la susceptibilidad de una mujer a contraer un cáncer de mama.

10 Los datos obtenidos en el presente estudio revelaron también una correlación entre el riesgo de contraer cáncer en sujetos masculinos con el nivel de pro-neurotensina o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto masculino; sin embargo, esta correlación no fue tan significativa para el presente conjunto de datos. Por lo tanto, existe un valor para el método descrito en este documento también para sujetos masculinos, pero en el presente estudio el efecto observado no fue tan fuerte para los hombres como para las mujeres.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo femenino vivo. Preferiblemente, en este documento el sujeto es una mujer.

15 La correlación entre el nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117, como se define en las reivindicaciones, en un fluido corporal obtenido de dicha mujer y el riesgo de contraer cáncer es continua, es decir cuanto mayor es el nivel, mayor es el riesgo. Esto se puede ver a partir de los datos, p. ej. en la tabla 6. En comparación con el primer cuartil, el segundo, tercer y cuarto cuartiles exhiben mayores riesgos de peligro, respectivamente.

20 En aras de la viabilidad, el experto en la técnica puede usar uno o varios umbrales.

Por lo tanto, la expresión "nivel elevado" puede significar un nivel por encima de un nivel umbral.

25 De acuerdo con la invención, el nivel de pro-neurotensina o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden neurotensina 1-117 en un fluido corporal es el nivel de pro-neurotensina en ayunas o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117, como se define en las reivindicaciones. El nivel de ayuno significa que no hay ingesta de alimentos 12 h antes del muestreo de sangre.

Se puede seleccionar un fluido corporal del grupo que comprende sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo (CSF) y saliva.

En una realización de la invención, dicha mujer nunca ha tenido un cáncer diagnosticado en el momento en que se toma la muestra de fluido corporal de dicha mujer.

30 En otra realización, dicha mujer ha sido diagnosticada antes con cáncer y se ha curado en el momento en que se tomaba la muestra de fluido corporal de dicha mujer y se determinaba el riesgo de recurrencia de contraer cáncer.

En una realización de la invención, dicha mujer ha sido diagnosticada con una enfermedad cardiovascular o diabetes en el momento en que se tomaba la muestra de fluido corporal de dicha mujer.

35 Dicha enfermedad cardiovascular puede seleccionarse del grupo que comprende insuficiencia cardíaca, aterosclerosis e hipertensión.

En otra realización de la invención, dicha mujer ha sido diagnosticada con diabetes tipo 2 en el momento en que se tomaba la muestra de fluido corporal de dicha mujer.

40 La definición de diabetes es la siguiente: antecedentes de diagnóstico físico o de estar tomando medicación antidiabética o tener una glucemia completa en ayunas  $\geq 6,1$  mmol/l (téngase en cuenta que es  $= 7,0$  mmol/l en plasma) al inicio del examen.

La definición de normotensiva/presión arterial alta (HTA) es la siguiente:

HTA: presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg o presión arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg o en tratamiento con medicamentos antihipertensivos. Los sujetos que tienen presión arterial normal (PA) son todos los demás sujetos, es decir, sujetos con PA sistólica  $<140$  y PA diastólica  $<90$  y que no están tomando medicamentos antihipertensivos.

45 Los datos actuales sugieren una fuerte correlación entre el nivel de pro-neurotensina o sus fragmentos, como se define en las reivindicaciones, con el cáncer de mama en mujeres sin diabetes prevalente, sin cáncer de mama prevalente y sin enfermedad cardiovascular prevalente.

50 Los datos actuales también sugieren una fuerte correlación entre el nivel de pro-neurotensina o sus fragmentos, como se define en las reivindicaciones, con el cáncer de mama en mujeres normotensas. Además, los datos actuales también sugieren una fuerte correlación entre el nivel de pro-neurotensina o sus fragmentos, como se define en las reivindicaciones, con el cáncer de mama en mujeres diabéticas.

En una realización específica del método según la invención, adicionalmente se determina al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo que comprende en edad, presencia de diabetes mellitus, tabaquismo.

Los fragmentos de pro-neurotensina que pueden determinarse en un fluido corporal pueden ser, p. ej., seleccionados del grupo de los siguientes fragmentos:

5 SEQ ID NO: 1 (pro-neurotensina 1-147)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVIKRRK IPYILKRQLY ENKPRRPYIL KRDSYYY

SEQ ID NO: 2 (pro-neurotensina 1-125 (neuromedina N grande)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVI KR KIPYIL

SEQ ID NO: 3 (neuromedina N), que se describe, pero no se reivindica

10 KIPYIL

SEQ ID NO: 4 (neurotensina) que se describe, pero no se reivindica

pyroQLYENKPRRP YIL;

SEQ ID NO : 5 (pro-neurotensina 1-117)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVI

15 SEQ ID NO: 6 (pro-neurotensina 1-132)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVIKRRK IPYILKRQLY EN

SEQ ID No 7: (pro-neurotensina 1-125)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPA  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVIKRRK IPYIL

SEQ. ID. N.º: 8 (pro-neurotensina 120-140) que se describe, pero no se reivindica

20 KIPYILKRQL YENKPRRPYI L

SEQ. ID. N.º: 9 (pro-neurotensina 120-147) que se describe, pero no se reivindica

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

SEQ. ID. N.º: 10 (pro-neurotensina 128-147) que se describe, pero no se reivindica

## QLYENKPRRP YILKRDSYYY

En una realización más específica del método de acuerdo con la presente invención, se determina el nivel de pro-neurotensina 1-117.

5 De acuerdo con la invención, el nivel de pro-neurotensina se mide con un inmunoensayo. Más específicamente, se usa un inmunoensayo como se describe en Ernst et al. (Peptides (2006), (27) 1787-1793). Un inmunoensayo que puede ser útil para determinar el nivel de pro-neurotensina, o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos, puede comprender los pasos descritos en el Ejemplo 2. Todos los umbrales y valores deben verse en correlación con la prueba y la calibración utilizada de acuerdo con el Ejemplo 2. Cualquier experto en la materia puede saber que el  
10 valor absoluto de un umbral puede estar influenciado por la calibración utilizada. Esto significa que todos los valores y umbrales dados en este documento deben entenderse en el contexto de la calibración utilizada en este documento (Ejemplo 2). ICI-Diagnostics, Berlín, Alemania, dispone de un calibrador P-NT humano. Alternativamente, el ensayo también puede calibrarse mediante P-NT 1-117 sintético o recombinante o fragmentos del mismo (véase también Ernst et. al., 2006).

15 El umbral para determinar el riesgo de contraer cáncer de mama en una mujer de acuerdo con los métodos de la presente invención es superior a 78 pmol/l PNT, preferiblemente 100 pmol/l, y más preferido 150 pmol/l. En una realización específica, dicho umbral es de aproximadamente 100 pmol/l. Estos umbrales están relacionados con el método de calibración mencionado anteriormente. Un valor de P-NT por encima de dicho umbral significa que el sujeto tiene un mayor riesgo de contraer cáncer o que ya tiene cáncer.

20 En una realización de la invención, dicho método se realiza más de una vez para controlar el riesgo de contraer cáncer de mama en una mujer o para controlar el curso del tratamiento. En una realización específica, dicho monitoreo se realiza con el fin de evaluar la respuesta de dicha mujer a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.

En una realización de la invención, el método se usa para estratificar a dichas mujeres en grupos de riesgo.

25 Se describe también un método para predecir el riesgo de contraer cáncer en una mujer o para identificar a una mujer que tiene un mayor riesgo de contraer cáncer según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el nivel de pro-neurotensina o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicha mujer, ya sea solo o junto con otros parámetros clínicos o de laboratorio de pronóstico útil, se usa para predecir el riesgo de un sujeto de sufrir un evento adverso mediante un método que puede seleccionarse de las siguientes  
30 alternativas:

- Comparación con la media del nivel de pro-neurotensina o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicha mujer en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "saludables" o "aparentemente sanos",
- Comparación con un cuantil del nivel de pro-neurotensina o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos en un  
35 fluido corporal obtenido de dicha mujer en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
- Cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o utilizando cálculos de índice de riesgo como el NRI (Índice de reclasificación neta) o el IDI (Índice de discriminación integrado).

40 De acuerdo con el método de la presente invención, el riesgo de que una mujer desarrolle cáncer puede reclasificarse como consecuencia de la determinación del nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicha mujer.

Se describe también un dispositivo de punto de atención para realizar un método de acuerdo con la invención.

45 Se describe también un aglutinante de neurotensina o de un receptor de neurotensina para su uso en la prevención o terapia del cáncer en mujeres.

El aglutinante descrito en este documento reduce la bioactividad de la neurotensina al 70% o menos.

De acuerdo con la invención, el cáncer es un cáncer de mama.

50 Se describe en este documento un aglutinante de neurotensina que se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, p. ej. IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica, o fragmentos de anticuerpos que contienen al menos el dominio variable F de la cadena pesada y/o ligera, como p. ej. anticuerpos acoplados químicamente (unión a fragmento de antígeno) que incluyen, entre otros, fragmentos Fab que incluyen minicuerpos Fab, anticuerpos Fab de cadena sencilla, anticuerpos Fab monovalentes con marcadores de epítipo, p. ej. Fab-V5Sx2;

5 Fab bivalente (mini-anticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, p. ej. formado mediante multimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, p. ej. mediante dimerización de dominios dHLX, por ejemplo, Fab-dHLX-FSx2; F(ab')<sub>2</sub>-fragmentos, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalentes y/o multiespecíficos multimerizados, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (activador de células T biespecíficas), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, p. ej. de una clase diferente a G; anticuerpos de dominio único, p. ej. nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélidos o peces.

10 Se describe en este documento un aglutinante de un receptor de neurotensina que se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, p. ej. IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica, o fragmentos de anticuerpos que contienen al menos el dominio variable F de la cadena pesada y/o ligera como p. ej. anticuerpos acoplados químicamente (unión a fragmento de antígeno) que incluyen, entre otros, fragmentos Fab que incluyen minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de cadena sencilla, anticuerpo Fab monovalente con marcadores de epítipo, p. ej. Fab-V5Sx2; Fab bivalente (mini-anticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, p. ej. formado mediante multimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, p. ej. mediante dimerización de dominios dHLX, por ejemplo, Fab-dHLX-FSx2; F(ab')<sub>2</sub>-fragmentos, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalentes y/o multiespecíficos multimerizados, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (activador de células T biespecíficas), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, p. ej. de una clase diferente a G; anticuerpos de dominio único, p. ej. nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélidos o peces, o un antagonista de péptidos, p. ej. [D-Trp<sup>11</sup>-Neurotensina, [Tyr(Me)<sup>11</sup>-Neurotensina (por ejemplo, descrita por Quiron et al.), o un antagonista no peptídico, por ejemplo Levocabastina, SR-48692 (NTS1 selectivo), SR-142948 (no selectivo), SR-142948A, CP 96345, [3H]SR-48692, SR 48692, SR-48527 y SR-49711, o una estructura de aglomerante, p. ej. estructuras basados en tetranectina no Ig (por ejemplo, las descritas en el documento US 2010/0028995), estructuras de fibronectina (por ejemplo, las descritas en el documento EP 1266 025; estructuras a base de lipocalina ((por ejemplo, las descritas en el documento WO 2011/154420); estructuras de ubiquitina (por ejemplo, las descritas en el documento WO 2011/073214), estructuras de transferencia (por ejemplo, las descritas en el documento US 2004/0023334), estructuras de proteína A (por ejemplo, las descritas en el documento EP 2231860), estructuras basadas en repetición de anquirina (por ejemplo, las descritas en el documento WO 2010/060748), microproteínas, preferiblemente microproteínas formando un nudo de cistina) estructuras (por ejemplo, las descritas en el documento EP 2314308), estructuras basadas en el dominio Fyn SH3 (por ejemplo, las descritas en el documento WO 2011/023685), estructuras basadas en el dominio EGFR-A (por ejemplo, las descritas en el documento WO 2005/040229) y estructuras basadas en el dominio Kunitz (por ejemplo, las descritas en el documento EP 1941867).

Otra medida preventiva puede ser la reducción de la secreción de neurotensina, p. ej. al observar una dieta baja en grasas u otras medidas dietéticas que pueden reducir la secreción de neurotensina.

### Ejemplos

#### 35 Ejemplo 1

Desarrollo de anticuerpos

Péptidos/conjugados para la inmunización:

40 Se sintetizaron péptidos para la inmunización (JPT Technologies, Berlín, Alemania) con un residuo de cisteína N-terminal adicional para la conjugación de los péptidos con albúmina de suero bovino (BSA). Los péptidos se unieron covalentemente a BSA usando el gel SulfoLink-Coupling (Perbio-science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se realizó de acuerdo con el manual de Perbio.

Péptido de anticuerpo marcado (LA) (P-NT 1-19):

**H-CSDSEEEMKALEADFLTNMH-NH<sub>2</sub>**

Péptido de anticuerpo en fase sólida (SPA) (P-NT 44-62):

45 **H-CNLNSPAEETGEVHEEELVA-NH<sub>2</sub>**

Los anticuerpos se generaron de acuerdo con el método siguiente:

50 Se inmunizó un ratón BALB/c con 100 µg de conjugado péptido-BSA en los días 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante de Freund completo) y 50 µg en los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante de Freund incompleto). Tres días antes de que se realizara el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, administrado como una inyección intraperitoneal y otra intravenosa.

Los esplenocitos del ratón inmunizado y las células de la línea celular de mieloma SP2/0 se fusionaron con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Después del lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Los clones híbridos se seleccionaron haciéndolos crecer en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640

suplementado con suero de ternera fetal al 20% y suplemento HAT]. Después de dos semanas, el medio HAT se reemplazó con medio HT durante tres ciclos, seguido de la vuelta al medio de cultivo celular normal.

5 Los sobrenadantes del cultivo celular se seleccionaron de forma primaria para anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas después de la fusión. Los microcultivos de prueba positiva se transfirieron a placas de 24 pocillos para su propagación. Después de volver a probar, los cultivos seleccionados se clonaron y volvieron a clonar de nuevo utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos.

10 (Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81: 223-228; (1985), Ziegler, B. et al. "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28: 11-15, (1996)).

Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos se produjeron mediante métodos de producción de anticuerpos estándar (Marx et al, Monoclonal Antibody Production (1997), ATLA 25, 121) y se purificaron mediante cromatografía de proteína A. Las perezas de anticuerpos fueron > 95% en base al análisis de electroforesis en gel de SDS.

15 Ejemplo 2

Inmunoensayo para la cuantificación de pro-neurotensina humana

La tecnología utilizada fue un inmunoensayo de luminiscencia de tubo recubierto en sándwich, basado en el marcado con éster de acridinio.

20 Compuesto marcado (trazador): 100 µg (100 µl) LA (1 mg/ml en PBS, pH 7,4, se mezcló con 10 µl de éster NHS de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (documento EP 0353971) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. La LA marcada se purificó por HPLC de filtración en gel en Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE. UU.) La LA purificada se diluyó en 300 mmol/l fosfato de potasio, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Na-EDTA, 5 g/l de albúmina de suero bovino, pH 7,0). La concentración final fue de aprox. 800.000 unidades de luz relativas (RLU) del compuesto marcado (aprox. 20 ng de anticuerpo marcado) por 200 µl. La quimioluminiscencia del éster de acridinio se midió usando un AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

25 Fase sólida: se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con SPA (1,5 µg SPA/0,3 ml 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris/HCl, pH 7,8). Después de bloquear con albúmina de suero bovino al 5%, los tubos se lavaron con PBS, pH 7,4 y se secaron al vacío.

30 Calibración:

El ensayo se calibró utilizando diluciones de suero humano con P-NT. Un grupo de sueros humanos con alta inmunorreactividad P-NT (InVent Diagnostika, Hennigsdorf, Alemania) se diluyó con suero de caballo (Biochrom AG, Deutschland) (estándares de ensayo).

35 Los estándares se calibraron mediante el uso del calibrador ProNT humano (ICI-Diagnostika, Berlín, Alemania). Alternativamente, el ensayo puede calibrarse mediante P-NT 1-117 sintético o recombinante o sus fragmentos (véase también Ernst et al., 2006).

Inmunoensayo ProNT:

40 Se pipetearon 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos con SPA, después de agregar LA marcado (200 µl), los tubos se incubaron durante 16-22 h a 18-25°C. El marcador no unido se eliminó lavando 5 veces (cada 1 ml) con solución de lavado (20 mmol/l PBS, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%).

La LA unida al tubo se midió utilizando el LB 953.

La Figura 1 muestra una curva típica de dosis/señal de P-NT.

Ejemplo 3

Estudio de la población

45 Métodos

50 Se midieron P-NT en plasma en ayunas de 2559 mujeres participantes en el examen de base de la población del estudio de dieta y cáncer de Malmö en 1991-1994 (hombres de  $58 \pm 6$  años y 59% de mujeres). Se utilizaron modelos de riesgos proporcionales de Cox, multivariados y ajustados (todos los factores de riesgo cardiovasculares tradicionales, factores de riesgo de diabetes y en análisis de cáncer también herencia para el cáncer) para relacionar la P-NT basal (razón de riesgo por cada aumento de desviación estándar de P-NT transformada logarítmicamente)



5 hasta el primer evento de cada uno de los puntos finales estudiados durante un tiempo de seguimiento medio de más de 12 años. Los puntos finales se obtuvieron a través del Registro de alta del hospital nacional sueco, el Registro de infarto de miocardio sueco, el Registro de accidente cerebrovascular en Malmö y el Registro de cáncer sueco. La recuperación de los puntos finales a través de estos registros se ha validado y se ha encontrado que es precisa (véase también Belting et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 1-10. \_2012 AACR).

Características clínicas de las mujeres en el estudio

Estadística descriptiva

Tabla 1

	N	Media	Desviación Std.
Edad en el examen MDCS	2559	57,554	5,9403
Presión arterial sistólica (mmHg)	2559	140,50	19,311
Presión arterial diastólica (mmHg)	2559	85,65	9,117
Índice de masa corporal (peso kgxkg)	2559	25,5196	4,19083
CINTURA (cm)	2559	76,99	10,245
Glucosa (mmol/l)	2559	5,0418	1,21798
Triglicéridos (mmol/l)	2559	1,2245	0,58404
Lipoproteína de alta densidad (mmol/l)	2559	1,5123	0,36949
Lipoproteína de baja densidad (mmol/l)	2559	4,2016	1,04762
P-INSULINA	2512	7,223	5,4223
P-NT (pmol/l)	2559	125,60633	77,681673

10 Tabla 2. Q + Agenda: Tratamiento antihipertensivo (C02, C03, C07, C08, C09) al inicio del estudio de acuerdo con el cuestionario o la agenda

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulativo
Válido No	2173	84,9	84,9	84,9
Sí	386	15,1	15,1	100,0
Total	2559	100,0	100,0	

Tabla 3

DIAB MELL (fb> 6,0 mmol/l o pos Q DM)

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulativo
Válido no	2396	93,6	93,6	93,6
sí	163	6,4	6,4	100,0
Total	2559	100,0	100,0	

15

Tabla 4

fumador actual 0

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulativo
Válido 0,00	1906	74,5	74,5	74,5
1,00	653	25,5	25,5	100,0
Total	2559	100,0	100,0	

Tabla 5

CUARTILES DE PNT EN MUJERES:

PNT (pmol/l)

Grupo percentil de PNT (pmol/l)	N	Mediana	Mínimo	Máximo
1	639	62,37000	5,100	78,580
2	639	92,07000	78,610	108,770
3	641	125,07000	108,960	150,000
4	640	194,38500	150,050	1154,520
Total	2559	108,96000	5,100	1154,520

5

Las concentraciones de cuartil fueron casi idénticas en todos los análisis de los subgrupos mostrados.

P-NT y predicción del cáncer de mama

Se evaluó la relación entre P-NT y el cáncer de mama (Tabla 6). Hubo una fuerte relación entre P-NT y el cáncer de mama en las mujeres. En un modelo totalmente ajustado, cada aumento de SD de P-NT se asoció con un riesgo 35% mayor de padecer cáncer de mama en el futuro y el cuartil superior versus inferior de P-NT identificó una diferencia de más del doble de riesgo de cáncer de mama (véanse tabla 6 y tabla 7).

10

Tabla 6

CÁNCER DE MAMA							
	HR por 1 SD	Valor P	Cuartil 1	Cuartil 2	Cuartil 3	Cuartil 4	P para tendencia
Mujeres (2140/135)	1,36 (1,14-1,59)	<0,001	1,0 (ref)	1,20 (0,69-2,07)	1,55 (0,93-2,61)	2,08 (1,27-3,42)	0,002

Modelos de riesgos proporcionales de Cox multivariados para P-NT basal versus incidencia de cáncer de mama

15

Tabla 7

MUJERES CON CÁNCER DE MAMA

(las mujeres con antecedentes cancerígenos fueron excluidas, 2140 mujeres/135 eventos)

Variables en la ecuación	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
AGE	0,004	0,017	0,058	1	0,810	1,004	0,971	1,039
AHT_B	-0,014	0,262	0,003	1	0,958	0,986	0,590	1,648
SBP_B	-0,001	0,005	0,013	1	0,911	0,999	0,989	1,010

BMI_B	0,046	0,025	3,230	1	0,072	1,047	0,996	1,100
HDL_B	-0,065	0,263	0,061	1	0,805	0,937	0,560	1,568
LDL_B	-0,080	0,093	0,752	1	0,386	0,923	0,769	1,107
fumador_actuaI0	0,298	0,201	2,202	1	0,138	1,347	0,909	1,996
LNIN S	-0,368	0,204	3,234	1	0,072	0,692	0,464	1,034
DM_B	-0,103	0,413	0,062	1	0,803	0,902	0,401	2,028
HER_CANCER_0	0,014	0,179	0,006	1	0,936	1,015	0,714	1,441
ZLN_PNT	0,307	0,087	12,520	1	0,000	1,360	1,147	1,612

Figura 2: Gráficos de Kaplan Meier, que ilustran el diagnóstico acumulativo de cáncer de mama en mujeres a) por debajo y por encima de la mediana de P-NT (109 pmol/l) y b) cuartil (Q) 1 vs cuartil 4 (por debajo de 79 pmol/l y por encima de 150 pmol/l);

- 5 Leyenda. Figuras 2a y 2b: El aumento de P-NT indica un riesgo a largo plazo mayor de desarrollo de cáncer de mama. Dado que se excluyó a cualquier mujer con antecedentes de cáncer en el día de referencia (muestreo de sangre), la PNT es altamente predictiva para detectar el desarrollo futuro de un cáncer de mama. Sobre todo, las mujeres de Q 4 tienen un riesgo 2 veces mayor de desarrollar cáncer de mama que las mujeres de Q 1.

Análisis de subgrupos en mujeres con y sin diabetes/presión arterial alta al inicio del estudio.

- 10 Definición. Diabetes: Antecedentes de diagnóstico físico o de estar tomando medicación antidiabética o tener una glucemia en ayunas  $\geq 6,1$  mmol/l (téngase en cuenta que esto es = 7,0 mmol/l en plasma) en el examen inicial.

Definición. normotensa/presión arterial alta (HTA):

HTA: presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg o presión arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg o tomando medicamentos antihipertensivos. PA normal: todos los demás sujetos.

- 15 Utilizando las mismas variables en la ecuación, se investigaron diferentes subgrupos de mujeres para la predicción del cáncer (se excluyeron las mujeres con antecedentes de cáncer):

Tabla 8

Subgrupo	Nº. de sujetos	Nº. de eventos	Riesgo de amenaza por 1SD PNT	Significancia (valor P)
todos	2140	135	36%	<0,001
Mujeres HBP	1294	79	26,3%	<0,05
Mujeres normotensas	846	56	52%	0,001
Mujeres sin antecedentes de eventos CV y sin diabetes	1984	128	35%	<0,001
Mujeres normotensas sin antecedentes de eventos CV y sin diabetes	891	52	45%	0,006

- 20 En todos los subgrupos, P-NT es significativamente predictivo del desarrollo de cáncer de mama. El poder predictivo de PNT fue ligeramente más fuerte en mujeres más saludables.

Ejemplo 4

Reclasificación de la mujer en grupos de riesgo

Métodos:

Se calcularon las estadísticas c del modelo y la reclasificación en categorías de riesgo pronosticadas a 10 años para los diferentes eventos (<5%, >= 5-10%, >= 10-20% y >= 20%, respectivamente) con Mejora de reclasificación neta (NRI) para modelos con y sin P-NT.

5 Pencina MJ, D'Agostino RB. Overall C as a measure of discrimination in survival analysis: model specific population value and confidence interval estimation. Stat Med. Jul 15 2004;23(13):2109-2123.

Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr., Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. Stat Med. Jan 30, 2008;27(2):157-172; discussion 207-112.

10 Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. Jama. Feb 14 2007;297(6):611-619.

Todos los análisis se realizaron con el software Stata versión 11 (StataCorp, College Station, Texas).

Un valor P de dos lados de <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados:

Discriminación y reclasificación de riesgo en mujeres

15 Al agregar P-NT a todos los factores de riesgo de cáncer de mama, se reclasificó significativamente a las mujeres en todas las categorías de riesgo de resultados de cáncer de mama a 10 años con un NRI del 25%. De las mujeres que luego desarrollaron cáncer de mama, el 34% fue trasladado a una categoría de riesgo más alta, mientras que el 27% de las mujeres que no desarrollaron cáncer de mama fue trasladado a una categoría de riesgo más baja. El valor estadístico C para el cáncer de mama aumentó después de agregar P-NT a todos los factores de riesgo conocidos de cáncer de mama en un 4,7% (Tabla 9).

Tabla 9:

Cáncer de mama; (n = 1657, 113; eventos);	C-estadístico	NRI
Modelo básico	61,4%	ref
+pro-neurotensina	66,1%	25% (P <0,001)

\*NRI clínico se refiere a movimientos correctos hacia arriba y hacia abajo a partir de la categoría de riesgo intermedio (10-20% de riesgo a 10 años) después de la adición de pro-neurotensina a los modelos básicos.

Ejemplo 5

25 Asociación de PNT y predicción del cáncer de mama en comparación con otros tipos de cáncer en mujeres y en comparación con la predicción de cáncer en hombres.

Existe una asociación altamente significativa de PNT y predicción de cánceres de mama. No existe una asociación significativa en el cáncer de cuello uterino, cáncer de útero y cáncer de ovario.

30 Esto respalda el hallazgo actual de que los niveles elevados de neurotensina/proneurotensina 1-117 en los fluidos corporales aumentan el riesgo de contraer cáncer cuando la neurotensina y/o la proneurotensina juegan un papel, es decir, en cánceres en los que el receptor de neurotensina se sobreexpresa en dichas células cancerosas.

Además, no existe ninguna asociación significativa de PNT y predicción de cáncer de próstata.

Tabla 10: Asociación de PNT y predicción de cáncer:

Mujeres	Nº. de eventos	valor p para diferencia en la línea de base	significancia
No hay sujetos en la línea de base: 2240			
Cáncer de mama	128	0,001	+++
Cáncer de cuello uterino	18	0,997	---
Cáncer de útero	18	0,366	---

Cáncer de ovario	15	0,94	---
masculino			
No de sujetos en la línea de base: 1911			
Cáncer de próstata	163	0,310	---

Descripción de la figura

La Figura 1 muestra una curva típica de dosis/señal de P-NT

5 Figura de la leyenda 2a y 2b: el aumento de P-NT indica un aumento a largo plazo del riesgo de desarrollar cáncer de mama. Dado que se excluyó a cualquier mujer con antecedentes de cáncer en el día de referencia (muestreo de sangre), la PNT es altamente predictiva para el desarrollo futuro de cáncer de mama. Sobre todo, las mujeres de Q4 tienen un riesgo 2 veces mayor de desarrollar cáncer de mama que las mujeres de Q1.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vitro para predecir el riesgo de contraer cáncer en mujeres que no padecen cáncer que comprende:
- determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 mediante un inmunoensayo o determinar el nivel de pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicha mujer; y
  - correlacionar dicho nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 con el riesgo de contraer cáncer, donde un nivel elevado es predictivo de un mayor riesgo de contraer cáncer, y
- donde dicho cáncer es un cáncer de mama y,
- donde dicha pro-neurotensina 1-117 es un péptido de acuerdo con la SEQ ID NO 5, y
- donde dichos péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se seleccionan de un grupo de péptidos que comprenden las secuencias de péptidos de SEQ ID N° 1, 2, 6 y 7, y
- donde el fluido corporal se toma de una mujer en ayunas.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que un nivel elevado significa un nivel por encima de un nivel umbral.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha mujer nunca ha tenido antecedentes de diagnóstico de cáncer en el momento en que se toma la muestra de fluido corporal de dicha mujer.
4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha mujer ha tenido un historial de diagnóstico de cáncer y se ha curado en el momento en que se toma la muestra de fluido corporal de dicha mujer y en el que el riesgo de recurrencia de contraer cáncer de mama está determinado.
5. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que en el momento en que se toma la muestra de fluido corporal de dicha mujer, dicha mujer ha sido diagnosticada con una enfermedad cardiovascular o diabetes.
6. Un método según la reivindicación 5, en el que en el momento en que se toma la muestra de fluido corporal de dicha mujer, dicha enfermedad cardiovascular se puede seleccionar del grupo que comprende insuficiencia cardíaca, aterosclerosis e hipertensión.
7. Un método según la reivindicación 5, en el que en el momento en que se toma la muestra de fluido corporal de dicha mujer, dicha mujer ha sido diagnosticada con diabetes tipo 2.
8. Un método según las reivindicaciones 1 a 7, en el que adicionalmente se determina al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo que comprende: edad, presencia de diabetes mellitus, tabaquismo actual.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina el nivel de pro-neurotensina 1-117.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 se mide con un inmunoensayo.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho método se realiza más de una vez para controlar el riesgo de contraer cáncer de mama en una mujer.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho monitoreo se realiza para evaluar la respuesta de dicha mujer a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para estratificar a dichas mujeres en grupos de riesgo.
14. Un método según la reivindicación 13, en el que dicha mujer se reclasifica como consecuencia de la determinación del nivel de pro-neurotensina 1-117 o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden pro-neurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicha mujer.

Figura 1:

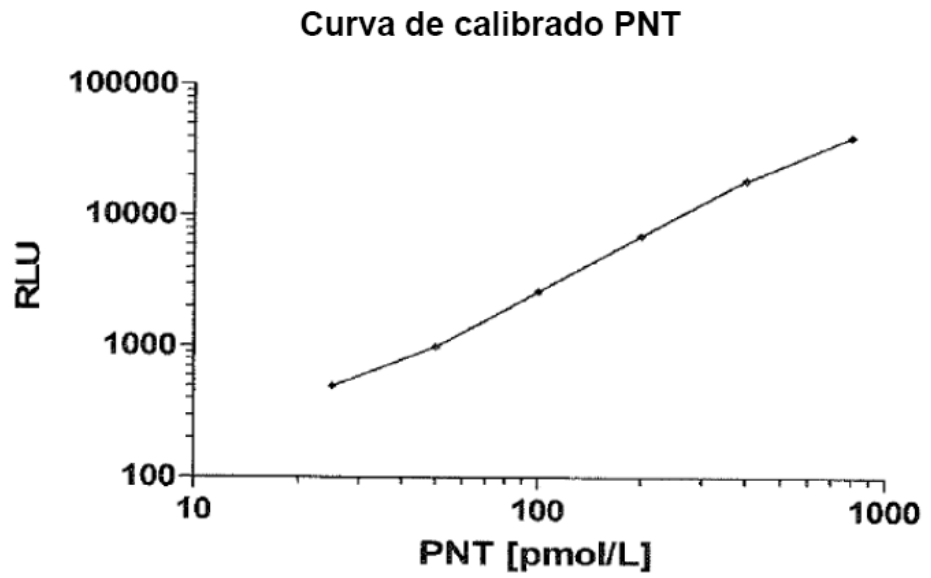


Figura 2a:

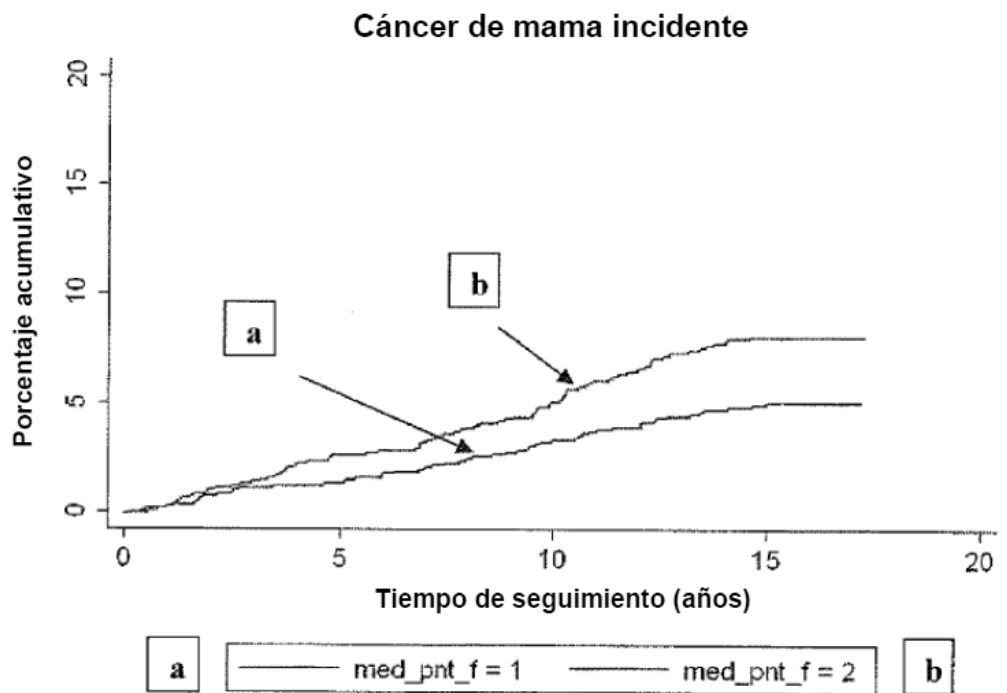


Figura 2b:

