

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 970**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08768379 .3**  
96 Fecha de presentación: **12.06.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2171448**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **Métodos para inhibir el crecimiento tumoral marcando como diana el intermedio de replicación de ADNmc de células madre tumorales**

30 Prioridad:  
**13.06.2007 US 934420 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.11.2012**

73 Titular/es:  
**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(100.0%)  
77 MASSACHUSETTS AVENUE  
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:  
**GOST JEVA, ELENA, V. y  
THILLY, WILLIAM, G.**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 389 970 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 inhibir el crecimiento tumoral marcando como diana el intermedio de replicación de ADNmc de células madre tumorales

5 **Antecedentes de la invención**

10 Los científicos han reconocido el parecido de las células tumorales y las construcciones tisulares patológicas (tales como teratocarcinomas) con las células y tejidos de embriones tempranos. Las células madre embrionarias normales pero no diferenciadas son capaces de dar lugar a órganos por procesos no definidos que lógicamente tienen que incluir el rápido aumento en el número de células y la diferenciación en un blastema de órgano y posterior organogénesis. Los tumores malignos crecen a tasas similares a los fetos tempranos y contienen nichos que están histológicamente no diferenciados u organizados con un aspecto histológico de tejido normal.

15 Los tumores y los tejidos fetales parecen compartir muchas moléculas y procesos en común. Por ejemplo, los glucosaminoglucanos antigénicos complejos en la superficie celular, los "antígenos carcinoembrionarios", se expresan tanto en tejidos fetales como en tumores, como las moléculas de adhesión celular. La oncogénesis como la ontogénesis parece proceder por un descenso lineal a través de una serie en expansión de células madre. Solamente una pequeña fracción de células de un tumor humano tiene la capacidad, solas o en concierto con otras

20 células, de formar nuevos tumores como xenoinjertos en roedores inmuno-suprimidos. Experimentos de xenoinjerto por dilución limitante han demostrado que una o más células entre las células tumorogénicas putativa presentan propiedades tipo célula madre ya que son capaces de generar nuevos tumores que contienen células madre adicionales así como de regenerar las poblaciones fenotípicamente mixtas de células presentes en el tumor original.

25 El concepto de monoclonalidad de tumores se estableció en los primeros años de 1900. Más recientemente, se determinó que casi todas las formas de cáncer de aparición tardía pasan a través de un periodo prolongado de preneoplasia y que estas colonias preneoplásicas eran en sí mismas monoclonales y resultantes de más de una mutación citogenética rara del ADN germinal. A principios del siglo 21, intentos directos por enriquecer poblaciones de células tumorales con células "madre" para experimentos de transplante/dilución habían demostrado que no

30 solamente eran células madre tisulares el origen probable de preneoplasia, sino que los propios tumores contenían células "madre". La moderna actualización de la hipótesis ha sugerido que los tumores son de hecho estructuras fetales heterogéneas razonablemente bien organizadas. Se esperaría que las células madre 'carcinoembrionarias' aumentarían en número y dieran lugar a tipos celulares diferenciados que poblarían las nichos altamente heterogéneos dentro de la masa tumoral.

35 Se han usado diversos marcadores antigénicos empleados en el campo de las células madre para enriquecer de células capaces de regenerar tejidos o tumores de forma ostensible a un elevado grado. Ninguna célula dentro de estas poblaciones enriquecidas, sin embargo, ha mostrado ninguna propiedad celular morfológica microscópica que las marque como células madre. Si es cierto que los tumores surgen de una única célula madre, se requiere un

40 medio para identificarlas y recogerlas como población homogénea de células madre suficiente para el análisis de analitos moleculares y bioquímicos. Es de principal importancia la identificación de dianas celulares tumorales para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a inhibir selectivamente el crecimiento, o eliminación, de las células madre de neoplasias y preneoplasias.

45 GOSTJEVA ET AL describe "Bell-shaped nuclei dividing by symmetrical and asymmetrical nuclear fission have qualities of stem cells in human colonic embryogenesis and carcinogenesis" en: CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NUEVA YORK, NY, EEUU vol. 164, nº 1, 1 de enero de 2006 páginas 16-24.

50 WADKINS R. M. ET AL describe "Actinomycin D binds to metastable hairpins in single-stranded DNA" en: BIOCHEMISTRY 25 AUGUST 1998, vol. 37, nº 34, 25 de agosto 1998 páginas 11915-11923.

55 WHITE R.J. ET AL describió "Development of mitoxantrone" en: INVESTIGATIONAL NEW DRUGS 1985, vol. 3, nº 2, 1985 páginas 85-93.

**Sumario de la invención**

60 Son necesarias mutaciones dentro de las poblaciones de células madre para generar células madre cancerosas. La moderna hipótesis de la "célula madre tumoral" derivada de las observaciones patológicas del siglo 19 postula que los tumores contienen subconjuntos únicos de células que tienen propiedades similares tanto a células madre normales como a tejidos fetales. Estas células proliferan extensivamente a través de rondas asimétricas y no mitóticas de divisiones celulares. Esta población de células probablemente es auto-renovante y es responsable del crecimiento y mantenimiento de la mayoría de los tumores. Por tanto, se cree ampliamente que la inhibición de la división de las células madre tumorales representa una nueva intervención terapéutica que promete eficacia

65 mejorada sobre los enfoques actuales.

La presente invención se basa en observaciones que indican que el periodo de crecimiento fetal/juvenil humano está asociado con una elevada tasa de mutación en el linaje de células madre y que este linaje emplea un modo previamente no detectado de segregación y replicación del ADN. Previamente descritas en la solicitud de patente de Estados Unidos número 2006/0063144 (patente de Estados Unidos 7.427.502) y el documento PCT/US06/047136 (patente internacional, publicación nº WO 2007/067795), las células madre tumorales y fetales se caracterizan por un morfotipo nuclear único mencionado como núcleos en forma de campana. (Los núcleos en forma de campana también se encuentran en sincitios y se entiende que los métodos de la presente invención descritos en este documento también abarcan núcleos en forma de campana presentes en sincitios así como en células). Las células madre tumorales y fetales que contienen núcleos en forma de campana se mencionan en este documento como metacariotas. La presente invención se basa en la observación de importancia primordial, descrita en este documento, de que los núcleos en forma de campana de células madre tumorales y fetales experimentan una forma única de replicación. Esta forma única de replicación genómica implica un intermedio de replicación con una configuración estructural nuclear en la que los núcleos en forma de campana se separan (como en una separación "copa-a-copa"), y que durante la separación una gran parte del genoma primero se segrega en ADN monocatenario (ADNmc) antes de la replicación genómica. Esta observación está en contraste con las previas observaciones de división de células humanas donde la síntesis del ADN procede por copia iterativa de cortos tramos de ADN seguida de condensación y separación de la cromátida en la mitosis en forma de ADN bicatenario (ADNbc).

Además, de igual importancia, es la observación de que durante esta forma única de replicación genómica, puede observarse una cantidad sustancial del ADNmc aparte del ADNmc contenido dentro de los núcleos en forma de campana, además este ADNmc está asociado con y es indicativo de la configuración del intermedio replicativo único para la replicación de células madre tumorales. De forma importante, estas observaciones clave, que durante la división nuclear en forma de campana, las células madre tumorales y fetales y sincitios están en una configuración intermedia donde el genoma es, durante un periodo de tiempo significativo y explotable, ADN sustancialmente monocatenario (ADNmc), dentro o fuera de los núcleos en forma de campana, pueden formar la base para métodos de ensayo de la eficacia de agentes y terapias anti-cáncer mediante de la detección de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc en la configuración intermedia replicativa o mediante la detección de ADNmc solo. Además, este modelo animal (o vegetal) de replicación genómica única para células madre tumorales y fetales y sincitios puede formar la base del diseño inteligente de nuevas terapias contra el cáncer abordando la inhibición o alteración de esta configuración intermedia replicativa de las células madre.

Por ejemplo, en esta configuración intermedia replicativa única de las células madre tumorales hay presente una gran cantidad de ADNmc dentro de los núcleos en forma de campana que pueden abordarse para su destrucción o degradación provocando la inhibición del crecimiento, o la muerte de una célula madre tumoral. Como alternativa, el ADNmc contenido en la célula madre tumoral pero no dentro de los núcleos en forma de campana también puede abordarse para su destrucción o degradación provocando la inhibición del crecimiento, o la muerte, de una célula tumoral. (Como se usa en este documento, las expresiones "célula madre tumoral" y "metacariota" se usan de forma intercambiable y pretenden incluir tanto células madre tumorales como células madre fetales). Como se usa en este documento, siempre que se usa la expresión "intermedio replicativo" o "configuración intermedia replicativa" junto con ADNmc, pretende incluir no solamente ADNmc contenido dentro de los núcleos en forma de campana, sino también ADNmc dentro de la célula madre tumoral que no está contenido dentro de los núcleos en forma de campana. Por tanto, por ejemplo, cuando se describen agentes en este documento que pueden abordar el ADNmc, se entiende que el ADNmc marcado como diana puede estar contenido en los núcleos en forma de campana o solo fuera de los límites de los núcleos en forma de campana.

Es razonable creer que también están presentes otras macromoléculas en esta configuración intermedia replicativa (por ejemplo, una macromolécula necesaria para este proceso de replicación se menciona en este documento como "molécula específica de célula madre tumoral" y esta expresión también abarca una "molécula específica de célula madre fetal" y una "molécula específica de sincitios" aunque no siempre está específicamente indicado). Una molécula específica de célula madre tumoral es una molécula presente en células madre tumorales, preferiblemente en el núcleo, y no en las células adyacentes (por ejemplo, también mencionada en este documento como una molécula celular particular para la célula metacariótica). Estas moléculas específicas de célula madre tumoral (por ejemplo, proteínas estructurales, nucleasas, etc.) también pueden servir como dianas para nuevas terapias anti-cáncer.

Por tanto, la presente invención se refiere a métodos para identificar agentes y terapias para la inhibición específica del crecimiento/proliferación, o destrucción completa, de células madre tumorales sin, o con un mínimo, daño a las células madre normales o de mantenimiento en su entorno cercano, y a las aplicaciones terapéuticas de dichos agentes. Como se describe en este documento, las células madre tumorales contienen núcleos con características en forma de campana morfológicas únicas donde, durante la división nuclear, el genoma es, durante un periodo de tiempo significativo y explotable, ADN sustancialmente monocatenario (ADNmc). Dichas células madre tumorales únicas, mencionadas en este documento como metacariotas, contienen característicamente núcleos en forma de campana que comprenden, a ciertos intervalos de tiempo, ADN monocatenario. Usando agentes, por ejemplo, agentes químicos o enzimáticos, que abordan y alteran el ADNmc de la célula metacariótica (por ejemplo, reactivos alquilantes, nucleasas específicas de una única hebra, conjugados tóxicos), se marca como diana el material nuclear de las células madre tumorales para su destrucción, ya que el ADNmc modificado sería incapaz de experimentar

replicación adicional de nuevo en ADN bicatenario (ADNbc).

También se describen métodos para identificar dianas o marcadores para células madre tumorales únicos para la configuración intermedia replicativa de la división de la célula madre tumoral. Dichas dianas pueden identificarse, por ejemplo, por aislamiento de la célula madre tumoral que contiene núcleos en forma de campana que experimentan replicación, cultivo de las células y recolección de las células madre tumorales cultivadas usando técnicas convencionales, y identificación del ARNm, transcritos o proteínas únicas para los intermedios replicativos, también usando técnicas bien conocidas para los especialistas en la técnica. El aislamiento de los metacariotas puede basarse en la presencia de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o ADNmc fuera del núcleo. Es razonable creer que el aislamiento y estudio de los metacariotas que provocan la identificación de las moléculas únicas para los intermedios replicativos descritos en este documento, conduciría a la identificación de nuevas dianas que serían útiles para terapias anti-tumorigénicas.

Se describen en este documento métodos *in vitro* e *in vivo* para la identificación de agentes que interactúan con la configuración intermedia replicativa única de núcleos en forma de campana. Dichos agentes pueden, por ejemplo, inhibir o modificar el crecimiento del tumor, o la célula madre tumoral, uniéndose a, alterando, desestabilizando, degradando o modificando de otro modo el ADNmc u otra molécula específica de células madre tumorales en la configuración intermedia replicativa en la célula madre tumoral, inhibiendo de este modo la replicación de la célula madre tumoral y/o ralentizando el crecimiento del tumor. En particular, se obtendrá una muestra del tumor (por ejemplo, una biopsia de tejido de un tumor sólido) de un sujeto, específicamente de un tumor sólido. La muestra del tumor puede ponerse en contacto con un agente candidato en condiciones fisiológicas adecuadas (por ejemplo, condiciones que conservan la configuración intermedia replicativa de núcleos en forma de campana), y la presencia de núcleos en forma de campana en el tumor/muestra del tumor, en particular las células madre tumorales, se comparará antes y después del contacto/tratamiento. Los agentes que inhiben el crecimiento tumoral se determinará comparando la cantidad de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc, o la cantidad de ADNmc solo, en la muestra después del tratamiento con el agente candidato con la cantidad de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o la cantidad de ADNmc solo en la muestra antes del tratamiento, y con la cantidad de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o la cantidad de ADNmc solo en una muestra de control de tratamiento simulado. La cantidad de ADNmc dentro de los núcleos en forma de campana o fuera de los núcleos en forma de campana puede determinarse cualitativamente por, por ejemplo, tinción con naranja de acridina, o puede determinarse una cantidad cuantitativa usando técnicas convencionales. Una reducción en la cantidad de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc, o la ausencia de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc (o la reducción en la cantidad de, o ausencia de, ADNmc solo) en el tumor o las células madre tumorales tratados, es indicativo de un agente de interés eficaz para abordar el ADNmc e inhibir el crecimiento de, o eliminar las células madre tumorales. También se puede ensayar la presencia o ausencia de intermedios replicativos de núcleos en forma de campana.

También se describe un modelo animal heterogéneo creado al inyectar al animal un xenoinjerto canceroso. Los animales adecuados para su uso en un método de ensayo *in vivo* son conocidos para los especialistas en la técnica, y pueden ser específicos del tipo particular de tumor a evaluar. Por ejemplo, típicamente se usan roedores tales como ratones y ratas para el análisis de tumores sólidos. El método comprende el trasplante del xenoinjerto en el animal, permitir que el xenoinjerto madure en un sólido tumor, tratar al animal de ensayo (y poner en contacto el tumor) con un agente/terapia candidato, escindir el tumor y analizar el tejido tumoral para la presencia o ausencia de intermedios replicativos de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o ADNmc solo en comparación con un animal de control (por ejemplo, un animal no tratado con el agente candidato). Pueden usarse procedimientos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos número 2006/0063144 (patente de Estados Unidos 7.427.502) para identificar estructuras nucleares en forma de campana. Adicionalmente, siguiendo los procedimientos descritos en el documento PCT/US06/047136 (patente internacional, publicación nº WO2007/067795) puede identificarse ADNmc dentro o fuera de los núcleos en forma de campana. Por ejemplo, el animal de ensayo puede tratarse con agentes que se sabe que se unen, modifican, alteran o degradan ADNmc (preferentemente sobre el ADN bicatenario que está presente en la célula) tales como agentes alquilantes, nucleasas de ADNmc, otras enzimas o proteínas. A diferencia de modelos clásicos de tumor que buscan la actividad de agentes basados en la reducción del tumor en crecimiento o los patrones de supervivencia del animal xenotransplantado con relación al control, esta estrategia implica evaluar el xenotrasplante en crecimiento para la presencia o ausencia de, o reducción en las células metacarióticas con tinción de ADNmc o en el ADNmc.

Por ejemplo, los agentes de interés (también mencionados en este documento como agentes candidatos) son agentes que reducen significativamente la cantidad de metacariotas con tinción con naranja de acridina con relación a un grupo de control. (El naranja de acridina tiñe ADN monocatenario y emite fluorescencia roja, mientras que en condiciones adecuadas el ADN bicatenario emite fluorescencia verde). En otra realización, se usan agentes que evitan la rehibridación del ADN por separado o junto con agentes que destruyen o degradan ADNmc. Los modelos de ensayo de la presente invención abordan el proceso metacariótico y por tanto identifican agentes para el tratamiento, no de la masa tumoral, sino del tumor superficial residual que no se trata con agentes convencionales que abordan las células tumorales mitóticas de rápida división.

También se describen métodos dirigidos a la inhibición terapéuticamente selectiva de células madre tumorales sin evitar o inhibir sustancialmente el crecimiento de las células adyacentes (por ejemplo, células madre de mantenimiento). Por ejemplo, aunque la célula madre marcada como diana está experimentando división nuclear, el método comprende poner en contacto la célula con un agente capaz de entrar en el núcleo de la célula y modificar o alterar la configuración intermedia replicativa de núcleos en forma de campana, modificando o alterando el ADNmc provocando que se evite la división nuclear adicional de los núcleos en forma de campana en la célula marcada como diana, y/o la destrucción de la célula. También pueden abordarse moléculas específicas de célula madre tumoral dentro de la célula, por lo cual el marcaje como diana y la alteración de la función o actividad de la molécula específica de célula madre tumoral, evita o inhibe el crecimiento de la célula tumoral. En realizaciones particulares, el agente es un agente químico, radioagente, enzima, o tratamiento de radiación, por el cual se marca como diana el intermedio replicativo de núcleos en forma de campana.

En base a los datos presentados en este documento, es razonable creer que la carcinogénesis parece ser un proceso continuo en el que se mutan ciertas células madre fetales/juveniles de modo que siguen creciendo como células madre juveniles durante toda la vida adulta y adquieren un cambio o cambios tales que crean una célula madre neoplásica que crece rápidamente (tasa fetal) y mata. Es tras el reconocimiento de un intermedio replicativo único y predominante en núcleos en forma de campana de fetos humanos, lesiones preneoplásicas y neoplásicas que se muestra que el ADNmc, en una forma previamente no reconocida de replicación y segregación de ADN de células madre, o una molécula específica de célula madre, también necesario para ese proceso de replicación único, constituye una nueva diana valiosa para terapias dirigidas a eliminar o ralentizar el crecimiento de las células madre de neoplasia y preneoplasia humana.

#### Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Se proporcionarán copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con el o los dibujos en color por la Oficina tras petición y pago de la tasa necesaria.

La FIG. 1 es un resumen de las imágenes clave. A) Ejemplos de morfotipos nucleares observados en células en interfase y profase temprana (E. P.) en intestino fetal humano, mucosa de colon normal, adenomas y adenocarcinomas. B) Imagen a alta resolución (x 1400) de núcleos en forma de campana de intestino fetal. El ADN condensado parece crear un anillo que mantiene una abertura en la estructura de campana hueca. Barra de escala, 5  $\mu\text{m}$ .

Las FIG. 2A y B son imágenes de intestino embrionario, 5-7 semanas. FIG. 2A: La imagen de contraste de fases (tramo izquierdo) y la imagen de núcleos teñidos (centro) y la imagen combinada (derecha) muestran las series lineales de núcleos dentro del sincitio tubular de ~50 micrómetros de diámetro. FIG. 2B: La imagen de alta resolución de los núcleos muestra estructuras huecas en forma de campana. La orientación 'cabeza a pies' de las campanas se conserva en todos los conductos embrionarios observados pero los conductos serpentean hacia delante o hacia atrás de modo que los conductos paralelos puedan tener una orientación localmente antiparalela de los núcleos en forma de campana. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$  a bajo aumento y 5  $\mu\text{m}$  gran aumento.

Las FIG. 3A-D muestran imágenes de fisión nuclear de núcleos en forma de campana en intestino fetal. FIG. 3A y B: Fisión nuclear *simétrica*. Los núcleos en forma de campana surgen de núcleos en forma de campana de forma similar. FIG. 3C y D: Fisión nuclear *asimétrica*. Un núcleo esférico, y un núcleo en forma de 'cigarro' que surgen de un núcleo en forma de campana. Barra de escala, 5  $\mu\text{m}$ .

Las FIG. 4A-C muestran imágenes de criptas de colon adulto normal. FIG. 4A: Criptas de aproximadamente 2000 núcleos esféricos, esféricos o discoides ocasionalmente (<1/100) contenían un núcleo reconocible en forma de campana (flecha) localizado en la parte inferior de la cripta. FIG. 4B: Base de la cripta que muestra otro núcleo en forma de campana. FIG. 4C: Morfotipos de núcleos en interfase y mitóticos de las paredes y la superficie luminal en una cripta bien extendida. Las imágenes ampliadas muestran: (i) núcleos esféricos y ovoides en interfase, (ii, iii) núcleos en profase temprana de forma esférica y oval, y (iv) un núcleo en ana-telofase. Barras de escala, 100  $\mu\text{m}$  para imágenes a bajo aumento y 5  $\mu\text{m}$  para imágenes a gran aumento.

Las FIG. 5A-E muestran imágenes de Adenomas. FIG. 5A: Cripta grande ramificante característica de adenomas. FIG. 5B: Una estructura tipo cripta irregular encontrada por todos los adenomas. Típicamente dos, pero a veces 1, 4 o incluso 8 núcleos en forma de campana (inserto) aparecen en la base de estas estructuras grandes (>4000 células) tipo cripta irregulares. FIG. 5C: Un grupo de células de morfotipo nuclear similar que contiene un núcleo en forma de campana. Estas formas de grupos contienen exactamente 16, 32, 64, y 128 células totales. Panel de la izquierda, tinción de Feulgen-Giemsa. Panel de la derecha, imagen autofluorescente con contraste de fases. FIG. 5D: Contextos en que los núcleos en forma de campana aparecen en adenomas: (i) Grupo con 31 núcleos ovoides y un núcleo en forma de campana, (ii) Múltiples núcleos en forma de campana en disposición paralela, (iii) Núcleos en forma de campana dispuestos en un patrón paralelo (flecha) (iii). Mezcla irregular de ~250 núcleos con varios núcleos en forma de campana, lo que sugiere bases de criptas nacientes. FIG. 5E: Estructura tipo cripta irregular que contiene aparentemente parches clonales de células 5 morfotipos nucleares diferentes con un núcleo en forma de campana (flecha) en la base. Barras de escala, 100  $\mu\text{m}$  (en 'a,b') y 5  $\mu\text{m}$  (en 'e').

Las FIG. 6A-E muestran imágenes de adenocarcinomas. FIG. 6A: Estructuras muy grandes tipo cripta (>8000 células), con ramificaciones con puntos de rotura frecuentes. La flecha indica un ejemplo de una estructura tipo cripta de ~250 células encontrada principalmente cerca de la superficie del tumor. FIG. 6B: Masa tumoral interior con múltiples núcleos en forma de campana (~3% del total de morfotipos nucleares). FIG. 6C: Núcleos en forma de campana de la FIG. 6B orientados en configuraciones paralelas sincitiales y no sincitiales de cabeza a pies. FIG. 6D: Fisión nuclear simétrica en adenocarcinoma. FIG. 6E: Fisión nuclear asimétrica de un núcleo en forma de campana que crea uno en forma de cigarro en adenocarcinoma. Se han observado estructuras similares en metástasis de colon al hígado. Barra de escala, 5  $\mu$ m.

Las FIG. 7A-D son ilustraciones de las fases en citometría cuantitativa de imágenes en el estudio de tejidos y células en seres humanos. FIG. 7A: Desecho quirúrgico de colon fresco listo para fijación. FIG. 7B: Preparación para portaobjetos microscópico que muestra el resultado de extender una sección de 1 mm a través de un pólipo (posicionamiento de un pólipo, 'de arriba abajo' está subrayado). FIG. 7C: Extensiones de núcleos celulares (en color magenta) observables para las criptas completas. Todos los núcleos de la cripta están conservados, en comparación con secciones de 5  $\mu$  (tinción BrdU y tinción H y M), mostradas anteriormente. FIG. 7D: Puesto de trabajo de análisis de imágenes microscopio motorizado Axioscop - cámara CCD a color AxioCam - software KS 400.

Las FIG. 8A y B son ilustraciones de una 'diana de interés' en aplicación de FISH para explorar núcleos en forma de campana no en división y en división en tumores. FIG. 8A: La cromatina (teñida más oscura a causa del mayor contenido de ADN por  $\mu$ m<sup>2</sup>) crea la estructura única que se parece a cromosomas en profase dispuestos en forma de dos círculos paralelos. Estos círculos puestos en dibujo ilustran la predicción de que cromosomas específicos podrían encontrarse en este sitio específico de núcleos en forma de campana. FIG. 8B: La distribución de la cromatina y el posicionamiento de cromosomas específicos cambia según tiene lugar la transformación imaginaria (aquí, núcleos con forma de 'campana-a-oval') durante toda la división asimétrica de los núcleos en forma de campana.

Las FIG. 9A-D son imágenes que ilustran los resultados de hibridación fluorescente in situ del cromosoma 11 en núcleos esféricos de células humanas TK-6. FIG. 9A: dos pares de cromosomas en extensiones de cromosomas en profase. FIG. 9B: tinción nuclear DAPI de núcleos esféricos. FIG. 9C: mismo par de cromosomas hibridado con la sonda de fluorescencia FITC. FIG. 9D: imagen combinada de tinción DAPI y FITC de cromosomas en interfase. Barra de escala, 5 micrómetros.

La FIG. 10 muestra imágenes de división nuclear simétrica de núcleos en forma de campana dispuestos en sincitios.

La FIG. 11 muestra imágenes que representan la localización del ADN en núcleos en forma de campana que experimentan división nuclear.

La FIG. 12 muestra la disposición y composición (ADNmc o ADNbc) del material nuclear durante la división nuclear de núcleos en forma de campana.

Las FIG. 13A-D muestran imágenes de preparaciones fetales humanas que representan una serie de formas nucleares previamente no reconocidas. Estas formas dan lugar a los núcleos en forma de campana originales. La FIG. 13A muestra un núcleo con una condensación de ~10% del contenido total de ADN en forma de un "cinturón" alrededor del eje longitudinal de los núcleos esféricos o ligeramente ovales. La FIG. 13B muestra un núcleo en el que dos "cinturones" nucleares condensados parecen haberse separado pero aún son parte de un único núcleo. La FIG. 13C muestra un par de núcleos que parecen haber surgido por fisión del núcleo de dos cinturones de la FIG. 13B. La FIG. 13D muestra que cada sincitio contiene una serie de campanas con un único par de campanas en su punto medio lineal con las bocas enfocando como en la FIG. 13C. Estas imágenes muestran que una serie de divisiones simétricas crea núcleos que empujan desde un par central.

Las FIG. 14A y B muestran morfotipos nucleares en adenomas (FIG. 14A) y adenocarcinomas (FIG. 14B) de colon. Los morfotipos de carcinogénesis muestran uno o dos cinturones similares alrededor del eje longitudinal de los núcleos ovales.

Las FIG. 15A-C muestran tinción FISH específica para centrómeros humanos. La FIG. 15 muestra centrómeros (brillante) en núcleos de forma esférica (FIG. 15A), "de cigarro" (FIG. 15B) y de campana (FIG. 15C) de tejidos de colon fetal humano de 12 semanas.

La FIG. 16 muestra un sincitio multi-nucleado que surge de un núcleo en forma de campana en músculos cardíacos fetales humanos, de aproximadamente 12 semanas de gestación. El método particular implica disociación enzimática del tejido seguida de tinción con naranja de acridina y microscopía de fluorescencia.

La FIG. 17 muestra la progresión de la síntesis del ADN en núcleos en forma de campana en división. El aumento en el contenido de ADN se indica encima de las imágenes y se representa gráficamente debajo. La imagen está capturada por citometría de imágenes de ADN Feulgen de alta resolución (1000 pb por píxel).

Las FIG. 18A-B muestran la configuración intermedia replicativa de núcleos en forma de campana utilizando intermedios de ADNmc. La FIG. 18A muestra la división simétrica de núcleos en forma de campana e indica el aumento correspondiente en el contenido de ADN. La FIG. 18B muestra la tinción con naranja de acridina de núcleos en forma de campana. La fluorescencia roja del tinte naranja de acridina indica la presencia de intermedios de ADNmc. El ADN bicatenario en las células adyacentes se indica por fluorescencia verde del tinte naranja de acridina.

La FIG. 19 muestra un diagrama de flujo del método para localizar células madre tumorales, crear muestras homogéneas, e identificar macromoléculas diana específicas de dichas células madre para diseño terapéutico inteligente.

Las FIG. 20A-F muestran una comparación paralela del patrón de intermedios de ADNmc en núcleos en forma de campana teñidos por naranja de acridina y anticuerpo contra ADNmc.

### Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere al descubrimiento de que células madre tumorales, por ejemplo células que se dividen conduciendo a tumores, se caracterizan por núcleos en forma de campana y experimentan una forma única de replicación. Los núcleos en forma de campana, se encuentran raramente en tejidos adultos, o se encuentran en cantidades enormemente reducidas, excepto para tejidos tumorales, experimentan periodos de tiempo en los que el  
10 genoma está representado como ADN monocatenario (ADNmc). Los núcleos en forma de campana se dividen de forma tanto simétrica como asimétrica por procesos de fisión no mitótica en tumores humanos de colon y páncreas (Gostjeva et al., *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 164:16-24 (2006); Gostjeva et al., *Stem Cell Reviews*, 1: 243-252 (2005)). Estos núcleos en forma de campana aparecen en grandes cantidades tanto en el intestino posterior embrionario de 5-7 semanas donde están encerrados en sincitios tubulares, y comprenden, por ejemplo, el 30% de  
15 todos los núcleos y como en tejidos tumorales donde abundan en nichos "no diferenciados". Tienen varias calidades tipo célula madre, particularmente el "shibboleth" de visión asimétrica y una frecuencia de fisión nuclear coherente con las tasas de crecimiento de tejido colónico humano preneoplásico y neoplásico (Herrero-Jimenez, P., et al., *Mutat. Res.*, 400: 553-78 (1998), Herrero-Jimenez, P., et al., *Mut. Res.* 447:73-116 (2000); Gostjeva et al., *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 164:16-24 (2006); Gostjeva et al., *Stem Cell Reviews*, 1:243-252 (2005)) Estas formas  
20 previamente no reconocidas son tanto la fuente de generación y diferenciación tumoral como, por tanto, dianas para estrategias terapéuticas contra el cáncer. La observación de que estos núcleos en forma de campana experimentan una fase en la que el genoma está sustancialmente representado como ADNmc permite su abordamiento y destrucción.

### 25 Métodos para identificar agentes anti-tumorigénicos

La observación inesperada descrita en este documento es que la replicación de células madre tumorales implica una configuración intermedia replicativa en la que los núcleos en forma de campana comienzan la separación en dos  
30 núcleos, y que durante la separación nucleica, una fracción sustancial del genoma de la célula madre tumoral primero se segrega en ADNmc. Durante esta configuración intermedia replicativa, están presentes grandes cantidades de ADNmc en los núcleos y en la célula que pueden detectarse usando métodos rutinarios. Esta observación cimienta la base para los métodos de exploración e identificación de agentes anti-tumorigénicos eficaces descritos en este documento que evalúan la utilidad de los agentes en la inhibición/prevenición de la proliferación de  
35 núcleos en forma de campana. Además, también pueden estar presentes moléculas específicas de célula madre tumoral en la célula durante esta configuración intermedia replicativa y también pueden servir como base de métodos de ensayo. Usando métodos descritos en este documento y en la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0063144 (patente de Estados Unidos 7.427.502) y la publicación de patente internacional PCT/US06/047136 n° WO 2007/067795 se pueden visualizar núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o ADNmc solo en  
40 una masa tumoral sólida, tanto antes como después del contacto o tratamiento con un agente anti-tumorigénico candidato, y comparar la densidad relativa de las células con núcleos en forma de campana (metacariotas) antes y después del tratamiento con el agente candidato/de ensayo, o con otros tejidos tumorales que no se han puesto en contacto/tratado con el agente. Una disminución en la densidad relativa, por ejemplo, la cantidad de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o ADNmc solo relativa a la cantidad de células o relativa al peso de la masa tumoral, indicaría que el agente es eficaz para reducir o prevenir la proliferación de células madre tumorales.

45 Por ejemplo, una muestra de tumor, por ejemplo, obtenida de un paciente o de un tumor sólido formado como un xenoinjerto en un organismo hospedador, se expondría a un agente anti-tumorigénico, por ejemplo, un agente que aborda ADNmc y degrada ADNmc, evita la hibridación de ADNmc, o evita la replicación de un molde de ADNmc, etc., basado en la configuración intermedia de ADNmc presente cuando los núcleos en forma de campana se  
50 dividen asimétricamente, después de haber determinado la densidad relativa de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc en toda o parte de la muestra de tumor. Después de exposición al agente, puede determinarse de nuevo la densidad relativa de núcleos en forma de campana. Si la densidad de núcleos que contienen ADNmc está disminuida o completamente ausente, entonces sería razonable creer que el agente candidato sería un agente anti-tumorigénico eficaz.

55 Más específicamente, se describe en este documento un método para identificar un agente que inhibe el crecimiento tumoral, que comprende poner en contacto una muestra del tumor en un sujeto o animal hospedador con un agente candidato, donde la muestra de tumor comprende células madre tumorales que contienen núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o ADNmc solo, y donde algunos o todos los núcleos en forma de campana están en  
60 una configuración intermedia replicativa; mantener la muestra en contacto con el agente candidato en condiciones adecuadas para que el agente interactúe con ADNmc; determinar la presencia de, ausencia de, o cantidad de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o ADNmc solo en la muestra de tumor después del contacto; y comparar la presencia de, ausencia de, o cantidad de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o ADNmc solo en la muestra después del contacto con el agente candidato con la presencia de, ausencia de, o  
65 cantidad de núcleos en forma de campana que contienen ADNmc o ADNmc solo en una muestra de control. La determinación de una reducción en o la ausencia de, en la cantidad de núcleos en forma de campana que contienen

ADNmc, o una reducción en o ausencia de ADNmc en la muestra después del contacto con el agente candidato indica que el agente inhibe el crecimiento tumoral.

5 Como alternativa, la presencia de, ausencia de, o cantidad de núcleos en forma de campana puede determinarse detectando la presencia de una, o más moléculas específicas de célula madre tumoral en, o en cercana proximidad de, la configuración intermedia replicativa. Además, los métodos descritos pueden usarse para detectar dichas macromoléculas específicas para la configuración intermedia replicativa de núcleos en forma de campana. Como los núcleos en forma de campana de células madre tumorales representan un caso no encontrado en otras células humanas, la identificación de estas moléculas facilita la identificación de dianas para el diseño de fármacos terapéuticos. Además, como una gran fracción del ADN en las células madre tumorales es monocatenario durante la replicación, las células madre en el proceso de división simétrica pueden aislarse para la identificación de macromoléculas por los especialistas en la técnica. Los ejemplos de macromoléculas potenciales que pueden estar implicadas con la configuración intermedia replicativa incluyen: proteínas de unión a ADNmc tales como proteínas ribonucleares nucleares heterogéneas; proteínas estructurales de mantenimiento de los cromosomas (SMC) implicadas en el movimiento físico y separación del ADNmc; nuevas proteínas centroméricas; enzimas implicadas en la reparación del ADN; nuevas polimerasas; y una serie de proteínas aún no identificadas.

20 Podría crearse un modelo animal heterogéneo adecuado inyectando al animal un xenoinjerto de cáncer. El xenoinjerto entonces se dejaría madurar en tumor sólido, que después podría escindirse. La presencia de células con núcleos en forma de campana, metacariotas o sincitios con núcleos en forma de campana podría confirmarse como se describe en este documento y en el documento PCT/US06/047136. El animal y/o el tumor entonces podrían exponerse a agentes que se sabe que evitan la rehibridación del ADNmc, se unen, modifican o degradan el ADNmc tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, nucleasas de ADNmc, u otras enzimas o proteínas, incluyendo agentes tales como, por ejemplo, anticuerpos, oligonucleótidos, ribozimas, riboproteínas, o proteínas de fusión que abordan ADNmc. Algunos ejemplos no limitantes incluyen carmustina, lomustina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida.

30 A diferencia de otros modelos de tumor que buscan la actividad de agentes basado en la reducción del tumor en crecimiento o los patrones de supervivencia del animal xenotransplantado con relación al control, esta estrategia implica evaluar el xenotransplante en crecimiento para la frecuencia de células metacarióticas con tinción de ADNmc. Los agentes de interés son agentes que reducen significativamente la cantidad de, por ejemplo, metacariotas con tinción de naranja de acridina relativa a un grupo de control (por ejemplo, una muestra de tumor no tratada o una parte o toda la misma muestra de tumor antes de la exposición al agente). Es razonable creer que los agentes/compuestos que interfieren con el intermedio replicativo de ADNmc de células tumorales en división se espere que aborden el proceso metacariótico, y por tanto sean agentes eficaces para el tratamiento, no de la masa tumoral, sino del tumor superficial residual que no se trata con agentes convencionales que abordan las células tumorales mitóticas de rápida división. Un especialista en la técnica necesitaría buscar solamente cambios que suceden en la cantidad o calidad del ADNmc de los núcleos en forma de campana, el ADNmc dentro del metacariota, así como cualquier cambio morfológico que suceda en la célula en forma de campana y el propio tumor, para determinar si el agente candidato (o agente de interés) sería un candidato viable para evaluación adicional. En particular, cambios en la morfología de la célula madre tumoral, cambios en la cantidad de ADNmc dentro del metacariota, o la morfología del propio tumor, pueden ser indicativos de que el agente candidato es eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral. Dichos cambios se manifestarían por una disminución en, o ausencia de, células madre tumorales.

45 La "diana de célula madre" en agentes terapéuticos contra el cáncer

50 Como resultado de los datos presentados en este documento, ahora hay métodos disponibles para suministrar agentes para abordar y destruir células madre tumorales sin o con daño mínimo a las células de su entorno cercano. Hay métodos disponibles para tratar preneoplasias, neoplasias (carcinoma) u otras patologías en un individuo, administrado un agente específico de ADNmc, o un agente que aborda una molécula específica de célula madre tumoral. El término, "tratamiento" como se usa en este documento, puede referirse a mejorar los síntomas asociados con el carcinoma o patología; a reducir, prevenir o retardar la metástasis del carcinoma; a reducir la cantidad, volumen, y/o tamaño de uno o más tumores; y/o a disminuir la gravedad, duración o frecuencia de los síntomas del carcinoma o patología. Un "agente terapéutico específico de ADNmc", como se usa en este documento, se refiere a un agente que aborda el ADNmc de células madre tumorales para su destrucción mediante la prevención de la formación de ADNmc, interferencia con la replicación de ADNmc o interferencia del copiado de ADNmc (por ejemplo, un agente quimioterapéutico), o trata de otro modo el carcinoma, o reduce o elimina los efectos del tumor o tumores o patologías del individuo. Como se usa en este documento, el ADNmc es importante en el mantenimiento de células madre tumorales, por lo tanto, la destrucción del ADNmc que provoca la prevención de la formación de ADNmc, interferencia con la replicación de ADNmc o interferencia del copiado de ADNmc, inhibirá la replicación de la célula madre tumoral y de este modo tratará el carcinoma o patología. Los métodos de tratamiento descritos se usan junto con uno o más de cirugía, terapia de ablación hormonal, radioterapia o quimioterapia. El agente quimioterapéutico, hormonal y/o radioterapéutico y el compuesto pueden administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente.



Los agentes químicos o enzimáticos que abordan y alteran el ADNmc (por ejemplo, reactivos alquilantes, nucleasas específicas de una única hebra, agentes que abordan la maquinaria de replicación, etc.) pueden utilizarse para abordar el material nuclear de células madre tumorales para su destrucción, ya que el ADNmc modificado sería incapaz de experimentar replicación adicional de nuevo en ADN bicatenario (ADNbc). La inhibición específica de células tumorales se consigue a través del uso de agentes que abordan específicamente el ADNmc, ya que el ADNmc es significativamente más abundante en los morfotipos nucleares heteromórficos de células madre tumorales en división que en células adyacentes. Por ejemplo, cualquier agente que evite la replicación del ADNmc, por ejemplo, una molécula que hibrida con ADN, pero es incapaz de prolongarse, por ejemplo, un oligonucleótido modificado o derivado de ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico que carece del  $\gamma$ -fosfato necesario para la extensión o un ácido péptido-nucleico. Se describe un método para tratar terapéuticamente a un paciente que tiene un tumor canceroso abordando específicamente el ADNmc de las células madre tumorales dentro de ese tumor, donde el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente alquilante, una nucleasa de ADN, un polipéptido de unión a ADN, un oligonucleótido o una molécula orgánica pequeña que se une específicamente al ADN monocatenario y destruye la célula madre tumoral, provocando de este modo el tratamiento terapéutico eficaz del tumor. Opcionalmente, el polipéptido, oligonucleótido u oligopéptido puede conjugarse con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Se conocen métodos en la técnica para suministrar agentes a células o tejido tumoral en un paciente, donde dichos agentes destruirían o evitarían la replicación del genoma de ADNmc, y de este modo evitarían la proliferación de las células madre tumorales.

Un agente se suministra de un modo específico de célula madre tumoral, utilizando un agente o resto que se une específicamente a ADNmc. Un agente que "se une específicamente" a ADNmc, como se usa el término en este documento, es un agente que se une preferencial o selectivamente a ADNmc y no a ADNbc. Aunque puede existir cierto grado de interacción no específica entre el agente que se une específicamente a ADNmc y ADN bicatenario, no obstante, la unión específica puede distinguirse a través del reconocimiento específico de ADNmc, en su totalidad o en parte. Típicamente, la unión específica estará favorecida por la abundancia relativa de ADNmc en células madre tumorales.

Otro método aborda específicamente el ADNmc de células madre tumorales. El ADNmc puede estar libre en el núcleo o puede estar unido en complejos nucleoproteicos. El ADNmc existe en conformaciones estructurales únicas que los especialistas en la técnica serán capaces de utilizar para direccionamiento específico. Por ejemplo, la termodinámica favorece la formación de estructuras cruciformes y bucles de horquilla. Pueden utilizarse anticuerpos para abordar específicamente estas estructuras. Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina obtenida por generación *in vitro* o *in vivo* de la respuesta humoral, e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. El término también incluye formas diseñadas por ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos Fv recombinantes de cadena sencilla (scFv). El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, tales como Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, rIgG, e IgG invertida, así como los dominios de cadena pesada variable y ligera variable. Puede generarse un anticuerpo inmunológicamente reactivo con ADNmc *in vivo* o por métodos recombinantes tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores fágicos o similares. Véase, por ejemplo, Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; y Ward, et al. (1989) Nature 341: 544-546; y Vaughan et al. (1996) Nature Biotechnology, 14:309-314. Un "fragmento de unión a antígeno" incluye cualquier parte de un anticuerpo que se une a ADNmc. Un fragmento de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un polipéptido que incluye una región CDR, u otro fragmento de una molécula de inmunoglobulina que retiene la afinidad y especificidad por ADNmc. Varios anticuerpos contra ADNmc están disponibles en el mercado. En un ejemplo específico, un especialista en la técnica podría identificar el fragmento Fv de cadena sencilla del anticuerpo de unión a ADNmc, que es la forma mínima de anticuerpo que aún retiene la especificidad y afinidad de unión monovalente del precursor de tamaño completo. El fragmento Fv de cadena sencilla se expresa como un único gen y podría fusionarse a una señal de localización nuclear para dirigir el fragmento de anticuerpo al núcleo. Es razonable creer que el fragmento Fv de cadena sencilla podría introducirse y expresarse dentro de un grupo de células tumorales mediante microinyección o terapia génica mediada por virus. Una vez unido a las abundantes estructuras secundarias de ADNmc, el fragmento de anticuerpo bloquearía la replicación y división de las células madre tumorales.

Un especialista en la técnica podría expresar y purificar polipéptidos de dominio de unión a ADNmc específicos conocidos *in vitro* utilizando métodos bien conocidos. Por ejemplo, los dominios específicos de ADNmc de la poliADP ribosa polimerasa (PARP) o la familia ribonuclear nuclear heterogénea de proteínas podría expresarse mediante un baculovirus u otro sistema de expresión de proteínas eucarióticas. Estos agentes podrían fusionarse adicionalmente en fase a secuencias peptídicas catiónicas de penetración celular para facilitar la rápida captación celular del péptido biológicamente activo. Como alternativa, podría utilizarse microinyección para introducir los polipéptidos en la célula.

Se introducen oligonucleótidos catiónicos de fosforamidato en las células madre tumorales para abordar de forma eficaz el ADN monocatenario. Un especialista en la técnica podría fabricar estos agentes de tal modo que abordarían de forma exhaustiva y aleatoria múltiples regiones de ADNmc. Estos agentes se unen con elevada afinidad a ADNmc y pasan fácilmente al interior de las células diana sin vectorización o transfección química.

El ADNmc puede abordarse específicamente a través de agentes químicos. Estos agentes reaccionan preferencialmente con bases nucleotídicas del ADNmc de un modo dependiente de secuencia o estructura secundaria. Los ejemplos incluyen actinomicina D, permanganato de potasio, bromoacetaldehído, cloroacetaldehído, pirocarbonato de dietilo, y tetróxido de osmio, como se expone en la siguiente Tabla 1. Aunque algunas de estas sustancias son tóxicas a elevados niveles, es razonable creer que los agentes pueden introducirse en el tumor de un modo localizado y selectivo de dosis, minimizando de este modo la toxicidad. Asimismo, aunque algunos agentes químicos se unen tanto a ADNmc como a ADN bicatenario, el nivel abundante de ADNmc en células madre tumorales facilita una dosis terapéutica extremadamente baja y más eficaz.

10 TABLA 1: Agentes químicos que se unen a ADNmc.

| Agente químico           | Mecanismo  |
|--------------------------|--|
| Actinomicina D           | Agente anti-tumoral extensivamente estudiado. Se une a estructuras de ADN en horquilla abundantes en ADNmc.  |
| Bromoacetaldehído        | Reacciona en las posiciones de apareamiento de bases de adeninas y citosinas. Reacciona preferencialmente con bases en bucles monocatenarios y cruciformes.        |
| Cloroacetaldehído        | Un metabolito de cloruro de vinilo que interacciona fácilmente con ADNmc para formar predominantemente lesiones eteno.   |
| Pirocarbonato de dietilo | Carboxietila purinas en la posición N-7, que abre el anillo imidazol. Reactividad sustancial hacia regiones monocatenarias de ADN.                                 |
| Tetróxido de osmio       | Se añade al doble enlace C-5, C-6 de pirimidinas en presencia de piridina para formar ésteres osmato. Sustancialmente más reactivo para ADNmc que ADN bicatenario. |
| Permanganato de potasio  | Específico de pirimidina y específico de una única hebra. Modifica bases mediante oxidación.   |

El agente terapéutico contra ADNmc comprende un componente/resto de agente activo y un componente/resto de agente de direccionamiento. El componente de agente de direccionamiento es o comprende un agente que se une específicamente a ADNmc, como se ha descrito anteriormente. El componente de agente de direccionamiento está ligado al componente de agente activo. Por ejemplo, pueden estar directamente unidos covalentemente entre sí. Cuando los dos están directamente unidos entre sí por un enlace covalente, el enlace puede formarse mediante la formación de un enlace covalente adecuado a través de un grupo activo en cada resto. Por ejemplo, un grupo ácido en un compuesto puede condensarse con una amina, un ácido o un alcohol en el otro para formar la correspondiente amida, anhídrido o éster, respectivamente. Además de los grupos ácido carboxílico, grupos amina, y grupos hidroxilo, otros grupos activos adecuados para formar enlaces entre un componente de agente de direccionamiento y un componente de agente activo incluyen grupos sulfonilo, grupos sulfhidrilo, y los derivados ácido haloico y anhídrido de ácido de ácidos carboxílicos.

El agente terapéutico puede comprender dos, o más restos o componentes, típicamente un resto de agente de direccionamiento con uno o más restos de agente activo. Pueden usarse enlazadores para ligar un agente activo a un componente de agente de direccionamiento, donde el agente de direccionamiento interacciona específicamente con ADNmc, o una molécula específica de célula madre tumoral, suministrando de este modo el agente activo a la configuración intermedia replicativa, e inhibiendo adicionalmente la replicación de los núcleos en forma de campana.

El componente de agente activo, que está ligado al componente de agente de direccionamiento, puede ser o comprender cualquier agente que consiga el resultado terapéutico deseado, incluyendo agentes tales como: un radionúclido (por ejemplo, <sup>1125</sup>, <sup>123</sup>, <sup>124</sup>, <sup>131</sup> u otro agente radiactivo); un agente quimioterapéutico (por ejemplo, un antibiótico, antiviral o antifúngico); un agente inmunoestimulador (por ejemplo, una citoquina); un agente anti-neoplásico; un agente anti-inflamatorio; un agente pro-apoptótico (por ejemplo, péptidos); una toxina (por ejemplo, ricina, enterotoxina, LPS); un antibiótico; una hormona; una proteína (por ejemplo, una proteína tensioactiva, una proteína de coagulación); un agente lítico; una molécula pequeña (por ejemplo, moléculas pequeñas inorgánicas, moléculas pequeñas orgánicas, derivados de moléculas pequeñas, moléculas pequeñas compuestas); nanopartículas (por ejemplo, formulaciones basadas en lípidos o no basadas en lípidos); lípidos; lipoproteínas; lipopéptidos; liposomas; derivados lipídicos; un ligando natural; una proteína alterada (por ejemplo, albúmina u otro sistema de suministro basado en proteínas vehículo sanguíneas, modificado para aumentar la afinidad por ADNmc o un derivado de anexina A1, orosomucoide); una enzima nucleolítica; un agente que inhibe el crecimiento, migración de la célula madre tumoral; un gen o ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido); vectores o sistemas de suministro génico virales o no virales; o un profármaco o promolécula. Un especialista en la técnica estará familiarizado con el diseño y aplicación del agente activo.

Por ejemplo, puede usarse un radionúclido u otro agente radiactivo como componente de agente activo. El componente de agente de direccionamiento suministra el agente radiactivo de un modo específico de tumor, permitiendo un daño local por radiación y provocando apoptosis y necrosis inducidas por radiación en todo el tumor incluyendo en células tumorales, células estromáticas, y células endoteliales del tumor.

Pueden usarse agentes quimioterapéuticos para enfermedades neoplásicas como componente de agente activo. Los agentes representativos incluyen agentes alquilantes (mostazas de nitrógeno, etileniminas, alquilsulfonatos, nitrosoureas, y triazenos) y otros agentes similares. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede ser un fármaco citotóxico o citostático. Los agentes quimioterapéuticos también pueden incluir aquellos que tienen otros efectos sobre las células, tales como reversión del estado de la célula madre a un estado diferenciado o aquellos que inhiben la replicación celular. Se enumeran ejemplos de agentes citotóxicos conocidos en, por ejemplo, Goodman et al., "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Sexta Edición, A. G. Gilman et al., eds./Macmillan Publishing Co. Nueva York, 1980. Algunos se exponen en la siguiente Tabla 2.

10

TABLA 2: Agentes quimioterapéuticos.

| Análogos de mostaza de nitrógeno | Alquilsulfonatos | Etileniminas | Nitrosourea    | Triazinas    |
|----------------------------------|------------------|--------------|----------------|--------------|
| Ciclofosfamida                   | Busulfán         | Tiotepa      | Carmustina     | Procarbazona |
| Clorambucilo                     | Treosulfán       | Triaziquona  | Lomustina      | Dacarbazina  |
| Melfalán                         | Manosulfán       | Carboquona   | Semustina      |              |
| Clormetina                       | Melfalán         |              | Estreptozocina |              |
| Ifosfamida                       |                  |              | Fotemustina    |              |
| Trofosfamida                     |                  |              | Nimustina      |              |
| Prednimustina                    |                  |              | Ranimustina    |              |
| Mecloretamina                    |                  |              |                |              |

15

Agentes citotóxicos adicionales incluyen alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina; enzimas, tales como L-asparaginasa; complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino, carboplatino, y oxaliplatino; urea sustituida, tal como hidroxiaurea; y derivados de metilhidrazina, tales como procarbazona. Como el ADNmc presenta una cantidad mayor de dianas de alquilación potenciales que el ADN bicatenario, los métodos descritos en este documento representan un medio para mejorar la eficacia de agentes quimioterapéuticos convencionales alquilantes del ADN. Inconvenientes notables de los regímenes quimioterapéuticos convencionales incluyen ausencia de especificidad y efectos secundarios adversos. Con el abordamiento selectivo del ADNmc en una población limitada de células tumorales vulnerables, es razonable creer que puede recalcularse un régimen de dosificación para una eficacia mejorada.

20

La mayor parte de los agentes quimioterapéuticos actualmente en uso para tratar el cáncer tienen grupos funcionales que son susceptibles a reticulación química directamente con un grupo amina o carboxilo de un componente de agente de direccionamiento. Por ejemplo, hay grupos amino libres disponibles en cisplatino, mientras que hay grupos ácido carboxílico libres disponibles en melfalán y clorambucilo. Estos grupos funcionales, es decir, aminos y ácidos carboxílicos libres, son dianas para una diversidad de agentes de reticulación química homobifuncionales y heterobifuncionales que pueden reticular estos fármacos directamente con un grupo amino libre.

25

La presente solicitud contempla específicamente métodos en los que el componente de agente de direccionamiento y/o el componente de agente activo comprende un resto quelador para quelar un metal, por ejemplo, un quelador para un radiometal o ión paramagnético. En realizaciones preferidas, el quelador es un quelador para un radionúclido. Los radionúclidos útiles dentro de la presente invención incluyen emisores gamma, emisores de positrones, emisores de electrones Auger, emisores de rayos X y emisores de fluorescencia, siendo los emisores beta o alfa preferidos para uso terapéutico. Los ejemplos de radionúclidos útiles como toxinas en radioterapia incluyen: <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>43</sup>K, <sup>47</sup>Sc, <sup>52</sup>Fe, <sup>57</sup>Co, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>71</sup>Ge, <sup>75</sup>Br, <sup>76</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>77</sup>As, <sup>77</sup>Br, <sup>81</sup>Rb, <sup>81m</sup>Kr, <sup>87m</sup>Sr, <sup>90</sup>Y, <sup>97</sup>Ru, <sup>99</sup>Tc, <sup>100</sup>Pd, <sup>101</sup>Rh, <sup>103</sup>Pb, <sup>105</sup>Rh, <sup>109</sup>Pd, <sup>111</sup>Ag, <sup>111</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>119</sup>Sb, <sup>121</sup>Sn, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>127</sup>I, <sup>128</sup>Ba, <sup>129</sup>Cs, <sup>131</sup>I, <sup>131m</sup>I, <sup>143</sup>Pr, <sup>153</sup>Sm, <sup>161</sup>Tb, <sup>166</sup>Ho, <sup>169</sup>Er, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>189</sup>Re, <sup>191</sup>Os, <sup>193</sup>Pt, <sup>194</sup>Ir, <sup>197</sup>Hg, <sup>199</sup>Au, <sup>203</sup>Pb, <sup>211</sup>At, <sup>212</sup>Pb, <sup>212</sup>Bi y <sup>213</sup>Bi. Los radionúclidos terapéuticos preferidos incluyen <sup>188</sup>Re, <sup>186</sup>Re, <sup>203</sup>Pb, <sup>212</sup>Pb, <sup>212</sup>Bi, <sup>109</sup>Pd, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>90</sup>Y, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>77</sup>Br, <sup>211</sup>At, <sup>97</sup>Ru, <sup>105</sup>Rh, <sup>198</sup>Au y <sup>199</sup>Ag, <sup>166</sup>Ho o <sup>177</sup>Lu. Las condiciones en las que un quelador coordinará un metal se describen, por ejemplo, por Gansow et al., patentes de Estados Unidos N° 4.831.175, 4.454.106 y 4.472.509.

35

40

El <sup>99m</sup>Tc es un radioisótopo particularmente atractivo para esta solicitud, ya que está fácilmente disponible para todos los departamentos de medicina nuclear, es económico, proporciona dosis mínimas de radiación al paciente, y puede fijarse fácilmente a oligonucleótidos de ADN mediante el resto nicotinamida de hidrazino. (Véase, por ejemplo, Hnatowich, et al., J. of Nuclear Med., 36:2306-2314 (1995)). Puede marcarse una selección de oligómeros aleatorios de ADN con tecnecio y se unirá a las secuencias correspondientes accesibles y abundantes en el ADNmc de células madre tumorales. El <sup>99m</sup>Tc tiene una vida media de seis horas que significa que es deseable un rápido direccionamiento del oligómero marcado con tecnecio. Por consiguiente, el agente terapéutico incluye un agente quelante para tecnecio.

50

El agente terapéutico también puede comprender agentes radiosensibilizantes, por ejemplo, un resto que aumenta la sensibilidad de las células a la radiación. Los ejemplos de agentes radiosensibilizantes incluyen nitroimidazoles, metronidazol y misonidazol. Véase, por ejemplo, DeVita, V. T. Jr. en Harrison's Principles of Internal Medicine, p. 68, McGraw-Hill Book Co., N.Y. 1983. El agente terapéutico contra ADNmc que comprende un agente

55

radiosensibilizante como resto activo, se administra y localiza en la célula metastásica. Tras la exposición del individuo a radiación, el agente radiosensibilizante se "excita" y causa la muerte de la célula.

5 Existe un amplio intervalo de restos que pueden servir como ligandos quelantes y que pueden derivatizarse como parte del agente terapéutico contra ADNmc. Por ejemplo, el ligando quelante puede ser un derivado de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietileno-triaminapentaacético (DTPA) y ácido 1-p-isotiocianato-bencil-metildietileno-triaminapentaacético (ITC-MX). Estos queladores típicamente tienen grupos en la cadena lateral mediante los cuales el quelador puede usarse para su unión a un componente de agente de direccionamiento. Dichos grupos incluyen, por ejemplo, bencilisotiocianato, 10 mediante el cual el DOTA, DTPA o EDTA puede acoplarse a, por ejemplo, un grupo amina del inhibidor.

Como alternativa, la solicitud incluye el uso de enzimas nucleolíticas específicas de ADNmc para destruir el ADNmc de las células tumorales. Por ejemplo, podría expresarse de forma ectópica DNAsa VI, nucleasa S1, RAD2, o cualquier otra endonucleasa humana específica de ADNmc dentro de una masa tumoral mediante expresión génica 15 mediada por virus o microinyección. Un especialista en la técnica estaría familiarizado con estos métodos bien conocidos. Como las células madre tumorales albergan niveles sustancialmente elevados de ADNmc en comparación con células adyacentes, las nucleasas tendrán efecto citotóxico potenciado sobre las células madre tumorales. Un especialista en la técnica podría diseñar moléculas de ARN catalítico (ribozimas) para someter la 20 estructura nucleotídica libre y desprotegida de ADNmc a ataque nucleófilo. Por ejemplo, puede conseguirse escisión específica de moléculas de ADN monocatenario en condiciones fisiológicas mediante una molécula de ARN catalítica que tiene actividad desoxirribonucleasa. Un ejemplo específico es un polímero ribonucleotídico que tiene un nucleótido 5' terminal con un azúcar ribosa que tiene un hidroxilo 2' nucleófilo. El gen APOBEC3G que codifica una citidina desaminasa específica de ADNmc podría marcarse como diana para células madre tumorales para 25 hipermutar el ADNmc, restringiendo de este modo la replicación. Un especialista en la técnica estaría familiarizado con el medio para construir vectores de expresión de APOBEC3G y suministrarlos a las células diana.

#### Suministro de agente

30 En los métodos de la solicitud, el agente puede administrarse como tal, o en una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica o fisiológica) que comprende el agente con un vehículo o excipiente fisiológicamente compatible. Puede administrarse *in vivo* (por ejemplo, a un individuo) o *in vitro* (por ejemplo, a una muestra tisular). Los métodos pueden usarse no solamente para individuos humanos, sino que también son aplicables para usos veterinarios (por ejemplo, para otros mamíferos, incluyendo animales domésticos (por ejemplo, caballos, vacas, 35 ovejas, cabras, cerdos, perros, gatos, pájaros) y animales no domésticos. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, aunque sin limitación, agua, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábica, aceites 40 vegetales, alcoholes de bencilo, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Las preparaciones farmacéuticas pueden, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, 45 estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influenciar en la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes, aromatizantes y/o aromáticas y similares que no reaccionan negativamente con los agentes activos.

Los métodos para la introducción de estas composiciones incluyen, aunque sin limitación, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, intravenoso, subcutáneo, tópico, oral e intranasal. Otros métodos 50 adecuados de introducción también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables, dispositivos de aceleración de partículas ("pistolas génicas") y dispositivos poliméricos de liberación lenta. Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse como parte de una terapia de combinación con otros agentes.

La composición puede formularse de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para su administración a seres humanos o animales. Por ejemplo, las composiciones para administración 55 intravenosa típicamente son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición 60 se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes pueden mezclarse antes de su administración.

Por tanto, como resultado de la presente invención, ahora hay métodos de ensayo disponibles para identificar 65 nuevos agentes terapéuticos adecuados para su uso en la inhibición de la replicación de núcleos en forma de campana de células madre tumorales y fetales. Además, también están disponibles nuevos métodos terapéuticos para tratar preneoplasias y neoplasias asociadas con células madre tumorales con núcleos en forma de campana.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención y no pretenden ser limitantes de ningún modo.

## Ejemplos

5

A continuación hay una descripción de los ejemplos.

Ejemplo 1. Establecimiento de una fuente de tejidos y tumores.

10 Se obtuvieron muestras de tejido adulto y tumor en forma de desechos quirúrgicos por y de colaboradores en el Massachusetts General Hospital, Department of Pathology (Gostjeva, E. et al., Cancer Genet. Cytogenet, 164:16-24, 2006). El uso de secciones tumorales y tisulares desechadas anónimas ha sido aprobado por el MIT Committee on Use of Humans as Experimental subjects a través del laboratorio del Prof. W. G. Thilly.

15 Desarrollo de un método para escisión, fijación y extensión del tejido y tinción del ADN.

El siguiente protocolo permite la visualización de núcleos de muestras tisulares y tumorales de claridad deseable para observaciones estructurales y cuantitativas de los cromosomas y núcleos. Los elementos clave son el uso de muestras tumorales frescas fijadas en 30 minutos tras la cirugía y la evitación del procedimiento convencional de seccionamiento fino. Los núcleos en forma de campana son aparentemente víctimas tempranas de autólisis en muestras tisulares y tumorales y ya no se pueden discernir unos 45 minutos después de la resección. Las secciones convencionales de 5 micrómetros simplemente cortan a través de las varias formas nucleares descubiertas, casi todas las cuales tienen diámetros mínimos mayores de 5 micrómetros. La técnica específica concebida es una evidencia de un progreso significativo:

25

En 30 minutos después de la resección, las láminas (~1 cm<sup>2</sup>) tales como mucosa colónica en tiras o secciones de ~1 mm de grosor de adenomas, adenocarcinomas o metástasis se colocan en al menos tres volúmenes de fijador de Carnoy a 4°C recién preparado (3:1, metanol:ácido acético glacial). El fijador fresco se reemplaza tres veces (cada 45 minutos) y después se reemplaza por metanol al 70% a 4°C para el almacenamiento de las muestras a -20°C. Las secciones fijadas se aclaran en agua destilada y se colocan en 2 ml de HCl 1 N a 60°C durante 8 minutos para la hidrólisis parcial de macromoléculas y despurinización del ADN. La hidrólisis se termina aclarando en agua destilada fría. La muestra aclarada se remojó en ácido acético al 45% (temperatura ambiente) durante 15 a 30 minutos para la "maceración del tejido" que permite la difusión y observación de secciones tisulares vegetales y animales con presión suave sobre los cubreobjetos de microscopio. Cada sección macerada se bisecciona en trozos de ~0,5 x 1 mm y se transfieren con 5 µl de ácido acético a un portaobjetos de microscopio bajo un cubreobjetos. Para la difusión del tejido, se colocan 5 capas de papel de filtro sobre el cubreobjetos. Se mueve un mango de pinzas progresivamente en una dirección a lo largo del papel de filtro con presión ligera y uniforme. En tejido colónico bien difundido no hay núcleos dañados cuando las criptas se presionan en lo que es esencialmente una monocapa. Los cubreobjetos se retiran después de congelar en hielo seco y los portaobjetos se secan durante una hora. Los portaobjetos se colocan en tarros de Coplin cargados con reactivo de Schiff para teñir parcialmente el ADN despurinado (tinción de Feulgen) a temperatura ambiente durante una hora, se aclaran en el mismo tarro de Coplin dos veces con 2xSSC (citrato trisódico 8,8 g/l, cloruro sódico 17,5 g/l), una vez durante 30 segundos y una vez rápidamente. Los portaobjetos después se aclaran con agua destilada y son adecuados para análisis de imágenes de los núcleos (Gostjeva, E., Cytol. Genet, 32:13-16, 1998). Para conseguir una resolución superior, los portaobjetos se tiñen adicionalmente con reactivo de Giemsa. Inmediatamente después de aclarar en 2xSSC, los portaobjetos se colocan en solución de Giemsa al 1% (Giemsa, Art. 9204, Merck) durante 5 minutos, después se aclaran rápidamente, primero en tampón de Sörensen (hidrogenofosfato disódico dihidrato 11,87 g/l, dihidrogenofosfato potásico 9,07 g/l), y después en agua destilada. Los portaobjetos se secan a temperatura ambiente durante una hora y se colocan en un tarro de Coplin cargado con xileno durante al menos 3 horas para retirar la grasa. Los cubreobjetos se pegan a los portaobjetos con medio de montaje DePex y se secan durante 3 horas antes de la exploración de alta resolución.

55 Como alternativa, la maceración puede conseguirse por exposición a enzimas proteolíticas tales como, por ejemplo, colagenasa II, para conseguir el aislamiento de células vivas con un morfotipo nuclear definido.

### Microscopio y sistema de procesamiento de imágenes.

60 El software para el análisis cuantitativo de imágenes que se usa en este documento utiliza un enfoque para la supresión del fondo adaptado a partir de sistemas previos de vigilancia de satélites. Esta tecnología se adquirió por la Kontron corporation en Alemania que desde entonces ha sido adquirida por Zeiss, Inc. Todas las imágenes se han obtenido usando un KS-400 Image Analysis System™, Versión 3.0 personalizado (Zeiss, Alemania) que consta de un microscopio óptico motorizado, Axioscope™, una cámara CCD a color, AxioCam™ (Zeiss, Alemania) conectada a un ordenador personal. Las imágenes se transmiten del microscopio a un aumento 1,4/100 del objetivo apocromático plano usando luz visible y un filtro de 560 nm (verde) cuando se empleó tinción de Feulgen sola. No se usa filtro cuando se emplea tinción de Feulgen-Giemsa. La placa de captura y la exposición óptima de luz se ajustan

65

antes de cada sesión de exploración. Las imágenes nucleares se registran a un tamaño de píxeles de 0,0223 x 0,0223 micrómetros.

#### Intestino embrionario.

5 Se encontraron siete morfotipos nucleares distintos (grande esferoide, esferoide condensado, ovoide, en forma de alubia, de cigarro, de salchicha y de campana) en todas las muestras de intestino fetal (FIG. 1A). Los núcleos en forma de campana parecían mantenerse abiertos por la cromatina condensada que se parece a cromosomas condensados (FIG. 1B). Los núcleos en forma de campana se organizaron en una orientación lineal 'cabeza a pies' dentro de conductos de ~20-50 micrómetros, o sincitios (FIG. 2). El patrón 'cabeza a pies' de los núcleos en forma de campana se conservó en todos los conductos embrionarios observados pero los conductos serpenteaban hacia atrás y hacia adelante de modo que los conductos paralelos tenían localmente una orientación anti-paralela de los núcleos en forma de campana.

15 Se observó que los núcleos en forma de campana experimentaban amitosis simétrica y asimétrica pero solamente dentro de los sincitios (FIG. 3). La amitosis simétrica de los núcleos en forma de campana se parecía a una separación simple de dos conos de papel apilados. A la mayor resolución, la cromatina condensada que se parecía a cromosomas apareados parecía formar un anillo que mantenía la "boca" de la campana en un estado abierto. Fuera de los sincitios tubulares frecuentemente se observaron mitosis para cada uno de los varios morfotipos nucleares "cerrados" y fueron evidentes pequeñas colonias que constaban de células de morfotipo nuclear idéntico. Se conservó la morfología nuclear "cerrada" específica en la profase temprana como se muestra en la FIG. 1.

#### Epitelio colónico normal.

25 Pudieron observarse casi todos los núcleos en criptas de la base de cripta a la superficie luminal (FIG. 4A). Muchas criptas se extendieron de tal modo que pudieron discernirse formas nucleares individuales. Células con núcleos ovoides o esferoides revisten la cripta justo por encima de la base a la extensión epitelial en la luz. (FIG. 4C). En las primeras ~2<sup>5</sup> células de la base de cripta, predominaba un noveno morfotipo nuclear potencialmente distinto que puede caracterizarse como discoide, ~2-3 micrómetros de grosor y ~10 micrómetros de diámetro (FIG. 4B). En menos del 1% de todas las bases de cripta en que las células estaban bien separadas, se discernió un núcleo en forma de campana solitario entre los núcleos aparentemente discoides (FIG. 4A y 4B). Se ha observado una baja frecuencia similar de núcleos en forma de campana en preparaciones de hígado adulto. En un colon adulto sin ninguna indicación patológica de neoplasia o preneoplasia no se observó ninguna otra variante morfológica nuclear en una exploración célula-por-célula de más de mil criptas bien extendidas.

#### Adenomas.

Los adenomas contenían muchas criptas, indistinguibles de criptas colónicas normales cada una con ~2000 células. Éstas se encontraban frecuentemente en formas ramificantes como se muestra en la FIG. 5A. Los mismos núcleos esferoides y ovoides en las paredes de cripta que en las criptas colónicas normales pero más frecuentemente que en el colon normal había uno o dos núcleos en forma de campana en la base de cripta. También se observaron estructuras lobulares irregulares que contenían hasta ~8000 células, cuyas células se difundían más fácilmente por maceración tisular. En casi todas las estructuras irregulares, había dos o más núcleos en forma de campana orientados con las aberturas de campana en la dirección del cuerpo de la estructura (FIG. 5B). Además, había muchas células y grupos diversos intercalados entre las criptas y las estructuras irregulares (FIG. 5C). Algunas estructuras regulares parecían estar creciendo hacia criptas normales de tamaño completo que contenían ~250, ~500 o ~1000 células. Se vieron muchos grupos de células como "anillos" de exactamente 8, 16, 32, 64 y 128 células cada uno con un núcleo en forma de campana (FIG. 5D).

50 Un examen a mayor aumento reveló que aunque la mayoría de las células de las paredes de las estructuras tipo cripta tenían núcleos esféricos u ovoides como en la cripta colónica adulta normal, aparecían colonias de células con núcleos en forma ovoide, de cigarro o bala en las estructuras lobulares irregulares, lo que sugiere una fusión de varias colonias diferentes. Las colonias con núcleos en forma ovoide y de cigarro se habían observado en el intestino posterior embrionario, pero el morfotipo nuclear en forma de bala se vio solamente en adenomas y adenocarcinomas (FIG. 5E). El morfotipo nuclear en forma de bala también surgió de núcleos en forma de campana por amitosis asimétrica con el extremo irregular surgiendo primero. Se observaron pequeñas colonias de células con núcleos en forma de bala y estas colonias contenían células que experimentaban mitosis ordinaria salvo por el hecho interesante de que las morfologías nucleares peculiares se retenían en algún grado desde la profase a la anafase.

60 Aunque raros en el colon adulto normal, los núcleos en forma de campana aparecían frecuentemente y en varios contextos de adenoma. Algunos se encontraron como grupos de una a diez o más "campanas" en los espacios entre las estructuras tipo cripta (FIG. 5D). Otros se encontraron como "campanas" individuales en estructuras anulares multicelulares en las que siempre se veía un núcleo de campana en el anillo con (2<sup>n</sup> - 1) células de morfotipo esferoide u otro morfotipo (FIG. 5C y 5D).

Los núcleos en forma de campana aparecía como campanas individuales, más a menudo como un par de campanas u ocasionalmente 4 u 8 campanas dentro de copa basal de las estructuras tipo cripta. En las estructuras lobulares irregulares mucho más grandes, los núcleos en forma de campana estaban integrados anatómicamente en las paredes de las estructuras aberrantes mezcladas con células de otras morfologías nucleares. Parecía como si estas estructuras tipo cripta irregulares más grandes fueran mosaicos de múltiples tipos diferentes de grupos, cada uno con su propio morfotipo nuclear. Se estimó que adenomas grandes (~1 cm) contenían aproximadamente 1000 núcleos en forma de campana. Se han observado cientos de núcleos en forma de campana en cada adenoma múltiple pero no se ha observado un único núcleo en forma de campana en ningún adenoma en la forma simétrica de fisión nuclear frecuentemente encontrada en secciones embrionarias; se han observado varios ejemplos de fisión nuclear asimétrica, sin embargo, en adenomas.

Adenocarcinomas.

Los adenocarcinomas como los adenomas contenían la mezcla de criptas, estructuras irregulares más grandes y grupos entre criptas de 16, 32, 64 y 128 células. Aún se encontraban núcleos en forma de campana en forma de singletes, pares o cantidades más grandes en la copa basal de las criptas e incrustados en espirales complejas en las paredes de las estructuras lobulares irregulares más grandes (FIG. 6). La serie de morfotipos nucleares en los adenocarcinomas parece ser idéntica a la serie observada en adenomas, incluyendo el morfotipo en forma de bala.

Una diferencia perceptible entre adenomas y adenocarcinomas fue que las estructuras tipo cripta estaban orientadas aleatoriamente con respecto a la superficie del tumor. Además no se encontraron criptas y estructuras irregulares frecuentemente en el interior del tumor, lo que puede caracterizarse mejor como un conjunto ecléctico pero no caótico de estructuras más pequeñas, localmente organizadas.

La diferencia más notable por la cual los adenocarcinomas diferían de los adenomas fue la frecuente aparición de agrupaciones aparentemente organizadas de más de cientos de núcleos en forma de campana, muchos de los cuales estaba frecuentemente (~1%) implicados en fisiones nucleares simétricas. Estas fisiones simétricas posteriormente se identificaron como comprendiendo material nuclear condensado. Un núcleo en forma de campana tendría una cantidad de ADN igual a la de una célula haploide normal. Según los núcleos en forma de campana empiezan a experimentar la división simétrica "copa-desde-copa", el contenido de ADN aumenta hasta 1,05 la cantidad del ADN contenido en un genoma haploide (aproximadamente el aumento que se espera si se replican los centrómeros). El contenido de ADN sigue a este nivel hasta mucho después en el proceso "copa-desde-copa", punto en el cual los dos núcleos contienen 2 veces la cantidad del material de ADN. Es durante la fase cuando quizá solamente los centrómeros se han replicado, y las hebras del genoma se separan, que el genoma está organizado principalmente en ADNmc. No es hasta mucho después en el proceso de replicación que el genoma vuelve a ser ADNbc de nuevo.

A bajo aumento, estas estructuras aparecían en los espacios entre estructuras tipo cripta y parecían una tela de araña o esqueleto de vetas foliares. A mayor aumento, se descubrió que las finas vetas eran cadenas parcialmente ordenadas de células con núcleos en forma de campana que tenían la curiosa característica de tener sus bocas orientadas en la misma dirección, 90° del eje de la veta (FIG. 6C). También se encontraron núcleos en forma de campana en sincitios localmente delimitados en la orientación 'cabeza a pies' (FIG. 6C) observada en el intestino embrionario pero no en los adenomas. Se estima que hay millones de núcleos en forma de campana en una masa adenocarcinomatosa con frecuente amitosis simétricas y asimétricas (FIG. 6D y 6E). Las metástasis de tumores colorrectal al hígado recrearon el patrón de morfotipos nucleares, criptas y estructuras irregulares aparentemente indistinguibles de los observados para adenocarcinomas.

Microscopía confocal sobre núcleos en forma de campana individuales conservados 3D y pares de núcleos en forma de campana en división simétrica.

Para realizar microscopía confocal sobre núcleos en forma de campana individuales conservados 3D y pares de núcleos en forma de campana en división simétrica, se usa el DeltaVision® RT Restoration Imaging System en el Imaging Center, Whitehead Institute. El sistema proporciona desconvolución 2D a tiempo real y proyección Z 3D para la restauración de las imágenes de los núcleos.

Se ha aplicado tinte de contraste del citoplasma nuclear (FITC-faloidina) y el núcleo (DAPI) para explorar la estructura interior de los núcleos en forma de campana. Las células se difunden en el portaobjetos siguiendo el mismo procedimiento que para la tinción de Feulgen: por maceración de 'hidrólisis'. La diferencia es que las fijaciones se aplican en dos fijadores diferentes para comparar los resultados: fijador de Camoy (4°C) y formaldehído al 3,7% durante 15 min. y solución de bloqueo durante 2 horas en BSA al 2% (2 g), leche desnatada al 0,2% (0,2 g), triton X-100 al 0,4% (400 µl) en 100 ml de PBS (temperatura ambiente), lo último recomendado para fijaciones de células de tejido vivo. Los portaobjetos microscópicos con extensiones tisulares sobre los mismos, después de lavarlos dos veces en PBS, se transfieren a una cámara húmeda, se dejan caer 100 ml de gotas de anticuerpos primarios diluidos apropiadamente en solución de bloqueo para cubrir el área entera de la extensión y se sellan los cubreobjetos en la parte superior mediante cemento de caucho, se colocan en un recipiente envuelto en lámina metálica y se colocan en la cámara húmeda en la estancia fría durante una noche. Los portaobjetos no sellados

después se lavan tres veces en PBS. Se extraen los portaobjetos y se colocan 100 µl de gotas de anticuerpos secundarios y/o tintes celulares (por ejemplo, FITC-faloidina, DAPI) diluidos apropiadamente en solución de bloqueo de nuevo para cubrir el área que contiene las células extendidas y se transfieren a la cámara húmeda colocada en el recipiente. El recipiente/cámara húmeda se sella, se envuelve en lámina metálica y se pone a temperatura ambiente durante 2 horas. Los portaobjetos se lavan cinco veces en PBS y se preparan de un modo que cada uno tenga 2-5 µl de gotas de medio de montaje (anti-decolorante *SlowFade*, *VectaShield* o *ProLong*). Los cubreobjetos se montan asegurando que se elimina el exceso de PBS (dar toquitos a la esquina del cubreobjetos con una toalla de papel). La cantidad de burbujas formadas durante el montaje se limita introduciendo el borde del cubreobjetos en el medio de montaje antes de descenderlo completamente. Los cubreobjetos se sellan sobre los portaobjetos usando laca de uñas y los portaobjetos se almacenan en la oscuridad a 4°C (o -20°C para periodos más largos). Los portaobjetos se visualizan usando el DeltaVision® RT Restoration Imaging System.

El protocolo del procedimiento de Feulgen-Schiff, que ha demostrado ser preciso para la localización histoquímica del ADN y la estequiometría, se usó para medir los contenidos de ADN en los núcleos. El contenido de ADN se midió en núcleos individuales midiendo la absorbancia de moléculas de un complejo Feulgen-ADN (colorante-ligando) (Kjellstrand, P., J. *Microscopy*, 119: 391-396, 1980; Andersson, G. y Kjellstrand, P., *Histochemie*, 27:165-200, 1971). Se midieron los núcleos en forma de campana no en división (interfase) y en división midiendo la densidad óptica integrada sobre el área completa (IOD) de cada núcleo individual usando el software adaptado del sistema de análisis de imágenes KS 400 (Zeiss Inc, Alemania).

Este puesto de trabajo de análisis de imágenes particular (véase la FIG. 9D) consta de un microscopio Axioscop 2 MOT (Zeiss) acoplado con una cámara CCD a color AxioCam (Zeiss) conectada a un ordenador, ensamblado por ingenieros de Carl Zeiss Inc., tiene capacidad de microscopía de imágenes de alta resolución de estructuras nucleares y celulares que es de aproximadamente 1000 pb de ADN por píxel en mediciones de cromosomas en profase temprana. Por lo tanto, son posibles mediciones precisas de dominios de cromatina condensada de ~1 Mpb en núcleos en interfase. Las imágenes se exploraron bajo parámetros constantes de aumento, exposición de luz y umbral (contorneado) de los núcleos usando un filtro verde de 560 nm. Este modo de medición del contenido de ADN se eligió como prometedor por los resultados más prometedores (Biesterfeld. S. et al., *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 23:123-128, 2001; Hardie, D. et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 50:735 - 749, 2002; Gregory y Hebert, 2002; Gregory, 2005).

Hibridación fluorescente *in situ* para definir la distribución espacial de los 24 cromosomas humanos en núcleos en forma de campana en interfase y durante la fisión nuclear.

Se usó FISH para determinar los cromosomas completos implicados en la condensación que aparece como un 'anillo' en la parte superior de los núcleos en forma de campana. Básicamente, el marcaje de los cromosomas en el 'anillo' se concibe como un medio para analizar su transformación cuando los núcleos en forma de campana dan lugar a núcleos de diferente morfología (como se muestra en la FIG. 10B) así como desarrollar un marcador de fluorescencia para reconocer estos núcleos por otro medio diferente a la morfología nuclear.

Se difunden células tumorales de no más de  $1-5 \times 10^7$  células por portaobjetos en el portaobjetos. Los portaobjetos se fijaron de dos modos diferentes de difusión de las células: uno usado en el protocolo para citometría de imágenes de ADN de Feulgen y otro propuesto por Gibson para el aislamiento de células epiteliales de muestras de biopsia colonoscópica (Gibson, P. et al., *Gastroenterology*, 96:283-291, 1989). El último es básicamente recoger un tejido tumoral en 30 min. desde la cirugía y colocarlo inmediatamente en 50 ml de solución salina balanceada de Hank, después lavarlo. Las muestras después se trituran con una cuchilla de escalpelo y se digieren durante 1,5 h en 4 ml de medio de colagenasa-dispasa (medio de cultivo que contiene 1,2 U/ml de dispasa I (*Boehringer Mannheim Biochemicals*, *Indianapolis, Ind.*) y 50 U/ml de colagenasa tipo IV (Worthington, Biochemical Corp., Freehold, N.J.). El sedimento se extiende sobre la superficie del portaobjetos de microscopio por ligera presión deslizante sobre el cubreobjetos. La difusión por maceración por 'hidrólisis' sirve como control positivo para comprobar si ha sucedido alguna distorsión de la morfología en forma de campana nuclear después de aplicar el tratamiento de colagenasa-dispasa para la difusión de las células. Los portaobjetos preparados se secan y se ponen a 37°C durante una noche. Después los portaobjetos se deshidratan secuencialmente en etanol al 70%, 80% enfriado con hielo, etanol al 100% a temperatura ambiente, durante 2 minutos cada uno y se secan completamente, experimentan desnaturalización en formamida al 70%/2xSSC a 72°C durante 2 minutos y se deshidratan inmediatamente de nuevo con la misma secuencia y se secan completamente. Se preparan mezclas de hibridación que contienen 7 µl de tampón de hibridación, 2 µl de agua estéril, y 1 µl de sonda. Las mezclas se desnaturalizan a 72°C durante 8 a 12 minutos y se añaden inmediatamente a portaobjetos que después se tapan con cubreobjetos, se sellan con cemento de caucho, y se ponen a 37°C en una caja humidificada, oscura durante una noche.

Los portaobjetos después se deshidratan en etanol al 70% frío, etanol al 80% frío, y etanol al 100% a temperatura ambiente durante 2 minutos cada uno; se desnaturalizan en formamida al 70%, 2xSSC a 72°C durante 50-60 segundos, dependiendo del grado de desnaturalización con ácido acético. Los portaobjetos se deshidratan de nuevo en etanol al 70% frío, etanol al 80% frío, y etanol al 100% a temperatura ambiente durante 2 minutos cada uno. La mezcla de hibridación incluye 7 µl de tampón de hibridación, 1,5 µl de H<sub>2</sub>O estéril, y 1,5 µl de sondas Whole



Chromosome Paint (Vysis) con colorante fluorescente Spectrum Orange o Spectrum Green aplicado. La mezcla de hibridación se desnaturaliza durante 5-10 minutos a 72°C y los portaobjetos posteriormente se secan completamente. La mezcla de hibridación se aplica a los portaobjetos, se tapan con cubreobjetos y se sellan con cemento de caucho. Los portaobjetos después se incuban durante una noche a 37°C en una caja humidificada. En el siguiente día, los portaobjetos se lavan en formamida al 50%, 2xSSC a 42°C dos veces durante 8 minutos cada uno. Los portaobjetos después se lavan con 2xSSC a 37°C durante 8 minutos y después se lavan tres veces en 1xPBD (Tween al 0,05%, 4xSSC) a temperatura ambiente durante 1 minuto cada uno. Después se añaden 10 µl de DAPI II Antifade, 125 ng/ml (Vysis) y se añaden los cubreobjetos. El exceso de DAPI II Antifade se retira por secado y los portaobjetos se sellan con cemento de caucho. Los portaobjetos se mantienen en la oscuridad a -20°C antes del procedimiento de exploración de imágenes.

Uso de citometría cuantitativa de ADN para rastrear la síntesis de ADN antes, durante y después la fusión nuclear de núcleos en forma de campana.

Las técnicas descritas en este documento permiten la detección de diferencias tan bajas como del 2% entre dos núcleos cualesquiera o las ana-telofases de núcleos hermanos durante la mitosis en cultivos de células humanas. Estas técnicas se usaron para determinar cuándo se sintetiza ADN por células o sincitios que contienen núcleos en forma de campana. Esto implicaba explorar núcleos que parecían estar en el proceso de fisión nuclear. Se observa que, en general, los núcleos en forma de campana fetal contienen la cantidad esperada de ADN de una célula humana diploide por comparación con el contenido de ADN de linfocitos humanos en el mismo portaobjetos teñido. Además, se observa que la cantidad de ADN en núcleos en forma de campana de lesiones preneoplásicas y tumores humanos revela una amplia variación alrededor de una media que es en promedio mayor que la cantidad de ADN diploide. Las mediciones han revelado otro hallazgo totalmente inesperado: la síntesis de ADN es concordante con el proceso de fisión nuclear para fisiones nucleares tanto simétricas como asimétricas que implican núcleos en forma de campana, en lugar de precederlo. Parece que los núcleos están ya en el proceso de separación 'copa-desde-copa' antes de que se detecte claramente un aumento en el contenido total de ADN a partir de la cantidad de un único núcleo. La cantidad total de ADN aumenta de un valor bajo que se aproxima al promedio de núcleos tumorales individuales en núcleos que aparentemente empiezan la fisión y alcanza aproximadamente dos veces el contenido nuclear promedio en núcleos que parece que justo han completado la fisión.

Ejemplo 2. Núcleos sincitiales en forma de campana en organogénesis fetal.

Se identificó una serie de formas nucleares previamente no reconocidas en preparaciones fetales humanas que dan lugar a los núcleos en forma de campana. Estas formas se detectaron en la quinta semana, así como los primeros sincitios tubulares, que contienen núcleos en forma de campana. Se muestran ejemplos de éstos en las FIG. 13A-D. Éste es un importante hallazgo que marca la transición morfológica de núcleos esféricos mitóticos de embriogénesis temprana a los posteriores núcleos en forma de campana amitóticos que representan el linaje generativo de células "madre" de crecimiento neto y diferenciación.

Estos hallazgos son constantes en todos los tipos de tejidos, ya que se han observado en una serie de preparaciones tisulares incluyendo, por ejemplo, músculo, extremidades en desarrollo, tejidos nervioso y órganos viscerales incluyendo el estómago, el páncreas, la vejiga, el pulmón y el hígado. Los sincitios se hallan en forma de grupos de ~16-24 sincitios espaciados de forma regular dentro de la masa orgánica en desarrollo, cada uno con ~16 núcleos en forma de campana. Los sincitios son evidentes en el material humano menos desarrollado disponible (~5 semanas) y han desaparecido para la semana trece. Después de la semana doce, los núcleos en forma de campana se distribuyen de forma regular en tres dimensiones de un modo peculiar para cada órgano.

La FIG. 13A muestra un núcleo con una condensación de ~10% del contenido total de ADN en forma de un "cinturón" alrededor del eje longitudinal de núcleos esféricos o ligeramente ovales. La FIG. 13B muestra un núcleo en el que parece que dos "cinturones" nucleares condensados se han separado pero aún son parte de un único núcleo. La FIG. 13C muestra un par de núcleos que parece que han surgido por fisión del núcleo de dos cinturones de la FIG. 13B. La FIG. 13D muestra que cada sincitio contiene una serie de campanas con un único par de campanas en su punto medio lineal con las bocas enfocando como en la FIG. 13C. Estas imágenes no sugieren que una serie de divisiones simétricas crea núcleos que se alejan de un par central. La estructura sincitial se detecta en grupos tan pequeño como cuatro núcleos en forma de campana.

En estudios de los morfotipos nucleares de carcinogénesis, los núcleos mostraron cinturones similares - uno o dos alrededor del eje longitudinal de núcleos ovales - en cantidades pequeñas en adenomas (FIG. 14A) y adenocarcinomas (FIG. 14B) colónicos. Este hallazgo confirma y extiende su apoyo para la hipótesis general de que la oncogénesis comparte muchas etapas de transición fenotípica clave de la ontogénesis que presenta, sin embargo, un orden inverso de aparición.

Tinción FISH específica para centrómeros humanos.

Los núcleos en forma de campana extra-sincitiales realmente contienen ADN humano. La mayoría de los centrómeros están asociados con la región de ADN condensado en la boca de los núcleos en forma de campana en

muestras fetales. De forma interesante, protocolos FISH convencionales no tiñen núcleos en forma de campana o con otras formas intra-sincitiales, lo que sugiere que la vaina que contiene el elemento contráctil del sincitio puede bloquear la entrada de los reactivos FISH. La FIG. 15 muestra centrómeros (en verde) en núcleos esféricos (FIG. 15A), en forma de "cigarro" (FIG. 15B) y en forma de campana (FIG. 15C) de tejidos de colon fetal humano de 12 semanas.

También se observó que el contenido de ADN de núcleos hermanos se iguala en amitosis fetal de núcleos en forma de campana, pero revelan un marcado grado de segregación desigual del ADN en amitosis de núcleos en forma de campana en tumores humanos de múltiples tejidos de origen. Aunque no se han encontrado ejemplos de fisión amitótica entre los núcleos en forma de campana de pólipos preneoplásicos colónicos, se observa que la marcada dispersión del contenido de ADN entre las docenas de núcleos en forma de campana encontrado por pólipo sugiere que el reparto desigual del ADN es un fenómeno que funciona en preneoplasia así como en neoplasia, pero no en fisiónes fetales de núcleos en forma de campana. Estas observaciones amplían las observaciones de Virchow y Cohnheim de que el tejido tumoral y el tejido embrionario tienen características histológicas similares aunque también amplían las de Boveri de que las células tumorales en mitosis desvelan una gran fracción de cromosomas aberrantes común a todas las células del tumor - lo que sugiere un temprano origen común en la formación o segregación cromosómica inestable.

#### Morfología nuclear en ratones.

Todas las diversas formas de núcleos, en particular incluyendo los núcleos en forma de campana, formas presincitiales y sincitiales en morfología casi idénticas a las FIG. 13A-D se encontraron en tejido de ratones fetales con las formas presincitiales detectadas primero en fetos de 12,5 días, después en fetos de 14,5 - 16,5 días siguiendo de forma muy paralela el periodo de definición de los órganos en el ratón fetal. Aunque estos hallazgos en el ratón no son sorprendentes dadas las observaciones en seres humanos, abre un amplio espectro de posibilidades de estudio de organogénesis en especies no humanas, no éticas o posibles en seres humanos.

En muestras de desechos fetales fijados de calidad que varían de la quinta a la decimosexta semana de gestación, los sincitios ya no son evidentes pero los núcleos en forma de campana se distribuyen en patrones regulares en todos los órganos en crecimiento.

#### Ejemplo 3. Marcadores de células madre

Se usan abundantes sincitios y núcleos en forma de campana del intestino primitivo para aplicar una serie de procedimientos histoquímicos incluyendo FISH para definir las posiciones de cromosomas y elementos cromosómicos, diversas moléculas contráctiles (por ejemplo, actina) y otros marcadores identificables incluyendo aquellos habitualmente denominados "marcadores de células madre". Las técnicas descritas en este documento se aplican para la tarea de recoger sincitios y núcleos individuales usando el instrumento de microdissección ZEISS-P.A.L.M. El criterio de éxito es la recogida de una serie de muestras homogéneas con respecto a las formas sincitiales o morfotipos nucleares en cantidades iguales a o mayores de 10.000 equivalentes nucleares, cantidades suficientes para explorar ARNm celulares, las proteínas más habituales y los glucosaminoglucanos.

#### Ejemplo 4. Tinción con naranja de acridina

Se muestran datos adicionales para identificar las configuraciones intermedias replicativas en las FIG. 16-19. La FIG. 18B es de particular importancia. Demuestra de forma concluyente la presencia de un genoma de ADNmc dentro de los núcleos en forma de campana. Se utiliza un tinte de naranja de acridina, que da fluorescencia roja específica y exclusivamente cuando se une a ADNmc.

Antes de la tinción, los portaobjetos se expusieron a RNasa a una concentración de 2 mg/ml durante 2 horas a 37°C en baño de agua. Los portaobjetos se lavaron en EDTA durante 1 minuto, se aclararon en agua de calidad molecular y se procedió inmediatamente a la tinción en solución de naranja de acridina de acuerdo con el protocolo descrito en Bertalanffy (Ann New York Sci, 84: p. 227-238 (1960); Ann New York Sci 93:16: p. 717-747 (1962)). En resumen, se diluyeron 0,05 g de tinte de naranja de acridina en 500,0 ml de agua destilada y se añadieron 5,0 ml de ácido acético. La solución a temperatura ambiente se comprobó para que el pH estuviera en un intervalo de 3,1 - 3,4 cada vez antes de colocar los portaobjetos en un tarro de Coplin en la oscuridad a temperatura ambiente. Los portaobjetos se tiñeron durante 30 minutos, se aclararon en ácido acético al 0,5% en alcohol al 100%, en alcohol al 100%, en PBS y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia mientras aún estaban húmedos con el cubreobjetos sobre los mismos.

#### Ejemplo 5. Tinción con anticuerpos contra ADNmc

Se usó el anticuerpo monoclonal Mab F7-26 para detectar intermedios de ADNmc (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria). La solución madre de anticuerpos se diluyó 10x (con PBS y suero bovino fetal al 5%) antes de su uso. Se realizó una serie de etapas de lavado antes de aplicar el anticuerpo contra ADNmc, usando pepsina al 0,005% en HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM y formaldehído al 1% en MgCl<sub>2</sub> 50 mM (descrito en detalle, Fomina et al.,

2000). Después de cada etapa de lavado, los portaobjetos se lavaron 3x con PBS (5 minutos cada uno). Finalmente los portaobjetos se lavaron con Tween al 0,05%, después con proteína de bloqueo, BSA al 3% en Tween y de nuevo en Tween al 0,05%. Después de ello, los portaobjetos se trataron con Mab F7-26 en FBS al 5% durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de la aplicación de anticuerpo anti-IgG de ratón-FITC, Alexa 488 durante 30 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con DAPI, se deshidrataron en una serie de etanol, al 70%, 90% y 100%, se secaron al aire y se montaron en un medio 'Citiflour'.

Parece que los dobles anillos de ADNbc en la "boca" de los núcleos en forma de campana se segregan primero en dos anillos de ADNmc y éstos se copian para crear los cuatro anillos de ADNbc previamente observados como el inicio de la segregación en campana y el aumento del ADN usando tinción de Feulgen y citometría cuantitativa.

Es notable que en la fase sincitial metacariótica fetal en cualquier muestra tisular, solamente un 5-15% de los sincitios presentan ADNmc pero en aquellos sincitios con al menos un núcleo que presenta ADNmc, habitualmente se observan muchos otros, ampliando nuestras observaciones anteriores de que los núcleos en forma de campana en sincitios segregan y sintetizan el ADN de forma sincrónica. En base a las tasas de crecimiento de los fetos y la fracción de núcleos que revela algún ADNmc, hemos hecho una estimación preliminar de ~8 horas para la segregación/periodo sintético del ADN siendo el periodo de masas separadas de ADNmc algo menor de la mitad de este periodo. Véanse las FIG. 18A-F.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, los especialistas en la técnica entenderán que pueden hacerse diversos cambios en forma y detalles en la misma sin alejarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar un agente que inhibe el crecimiento tumoral, que comprende

- 5 a) poner en contacto un tumor de un sujeto no humano o un animal hospedador no humano con un agente candidato, en el que el tumor comprende células madre tumorales que comprenden núcleos en forma de campana, y en el que algunos o todos los núcleos en forma de campana están en una configuración intermedia replicativa asociada con ADNmc;
- 10 b) mantener el tumor en contacto con el agente candidato en condiciones adecuadas para que el agente interactúe con el tumor;
- c) escindir una muestra del tumor y determinar la presencia de, ausencia de, o cantidad de ADNmc en una configuración intermedia replicativa en núcleos en forma de campana, en la muestra tumoral después del contacto en la etapa b); y
- 15 d) comparar la presencia de, ausencia de, o cantidad de ADNmc en una configuración intermedia replicativa en núcleos en forma de campana, en la muestra tumoral después del contacto con el agente candidato con la presencia de, ausencia de, o cantidad de ADNmc en una configuración intermedia replicativa en núcleos en forma de campana en una muestra de control,

20 mediante el cual una reducción en la cantidad de, o ausencia de ADNmc en una configuración intermedia replicativa en núcleos en forma de campana, en la muestra después del contacto con el agente candidato indica que el agente inhibe el crecimiento tumoral.

25 2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra tumoral se obtiene de un tumor sólido resultante de un xenoinjerto en un organismo hospedador.















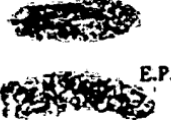





3. El método de la reivindicación 1, en el que ADNmc se detecta tiñendo la muestra con naranja de acridina y visualizando el ADNmc.

30 4. El método de la reivindicación 1, en el que el agente candidato

- a) aborda ADN monocatenario, preferiblemente en el que el agente candidato
- b) altera la hibridación del ADN, degrada ADN monocatenario, o altera la replicación del ADN a partir de un molde de ADN monocatenario.

35 5. El método de la reivindicación 1 en el que, en la etapa c), antes de la tinción, la muestra se expone a RNasa a una concentración de 2 mg/ml durante 2 horas a 37°C en un baño de agua, se lava en EDTA durante 1 minuto, se aclara en agua de calidad molecular y se tiñe inmediatamente en solución de naranja de acridina: 0,05 g de naranja de acridina diluidos en 500,0 ml de agua destilada y 5,0 ml de ácido acético, estando el pH a temperatura ambiente en un intervalo de 3,1-3,4, las muestras se colocan en un tarro de Coplin en la oscuridad a temperatura ambiente, se tiñen durante 30 minutos, se aclaran en ácido acético al 0,5% en alcohol al 100%, en alcohol al 100%, en PBS antes

40 de la visualización en un microscopio de fluorescencia mientras aún están húmedas con el cubreobjetos sobre ellas

| Morfotipos nucleares            | Intestino fetal   | Colon normal adulto   | Adenoma, adenocarcinoma   |
|---------------------------------|---|---|---|
| Núcleo en forma de campana      |  Profase temprana no observada   |  ★ |   |
| Núcleo esférico                 |       |    |   |
| Núcleo con forma oval           |       |    |   |
| Núcleo en forma de "cigarrillo" |       | no observado  |   |
| Núcleo en forma de "bala"       | no observado  | no observado  |  |
| Núcleo esférico condensado      |   | no observado  | no observado  |
| Núcleo en forma de "alubia"     |   | no observado  | no observado  |
| Núcleo en forma de "salchicha"  |    | no observado  | no observado  |

**a**

FIG. 1A



FIG. 1B

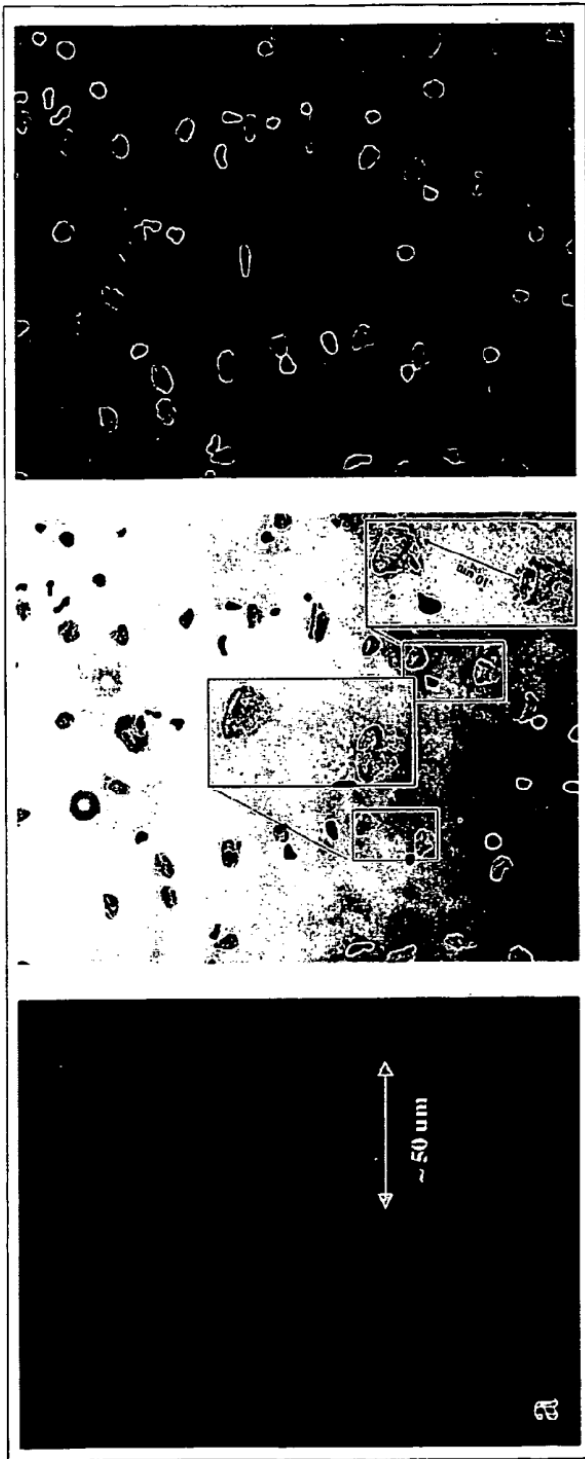


FIG. 2A



FIG. 2B

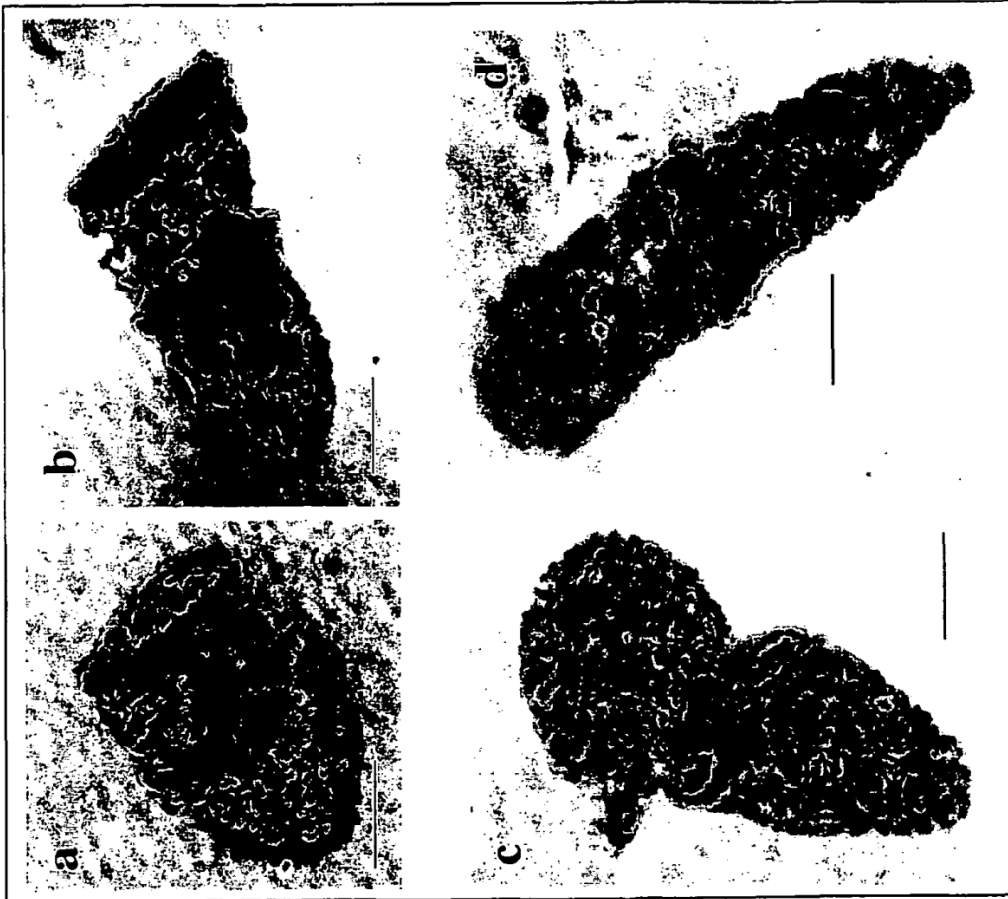


FIG. 3

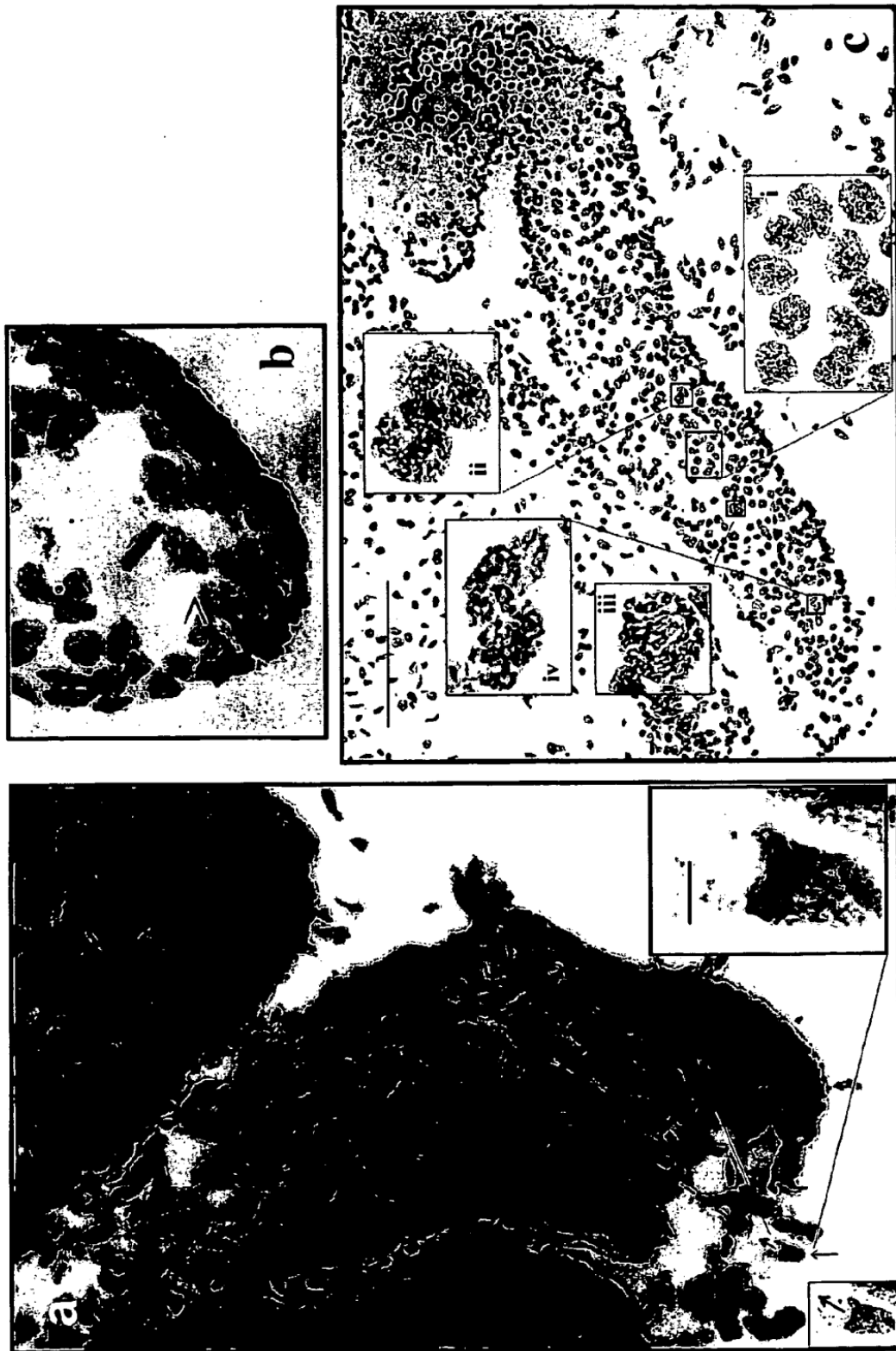


FIG. 4



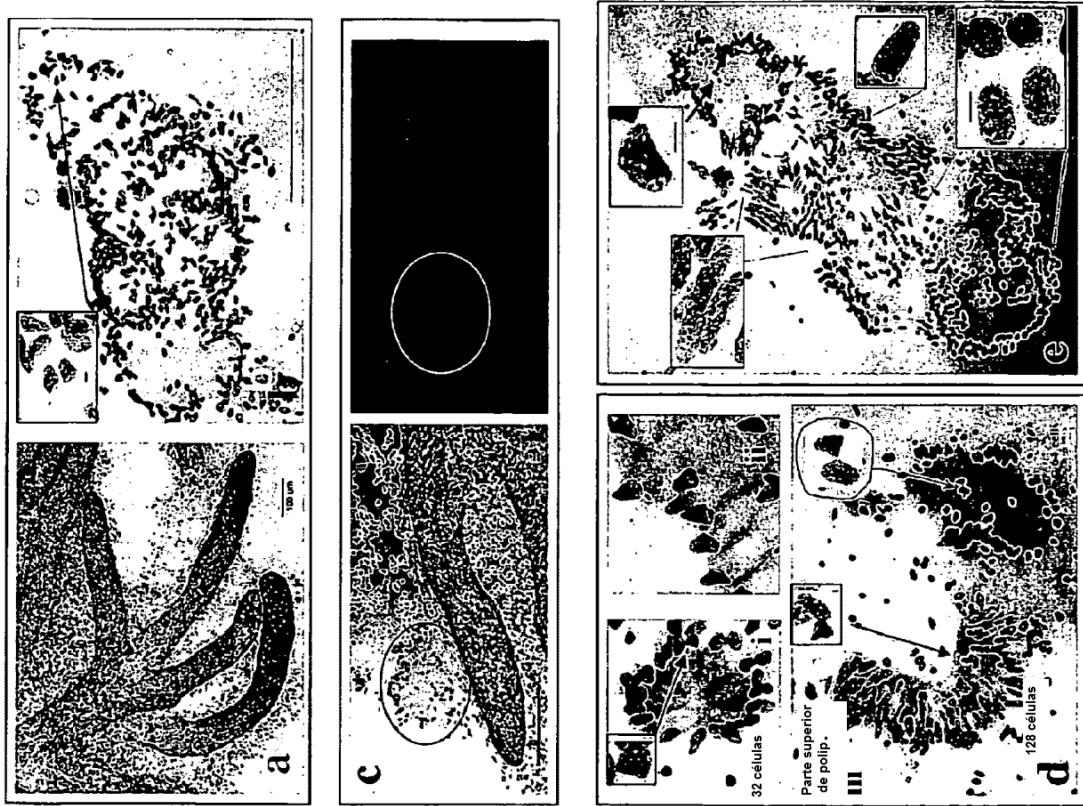


FIG. 5

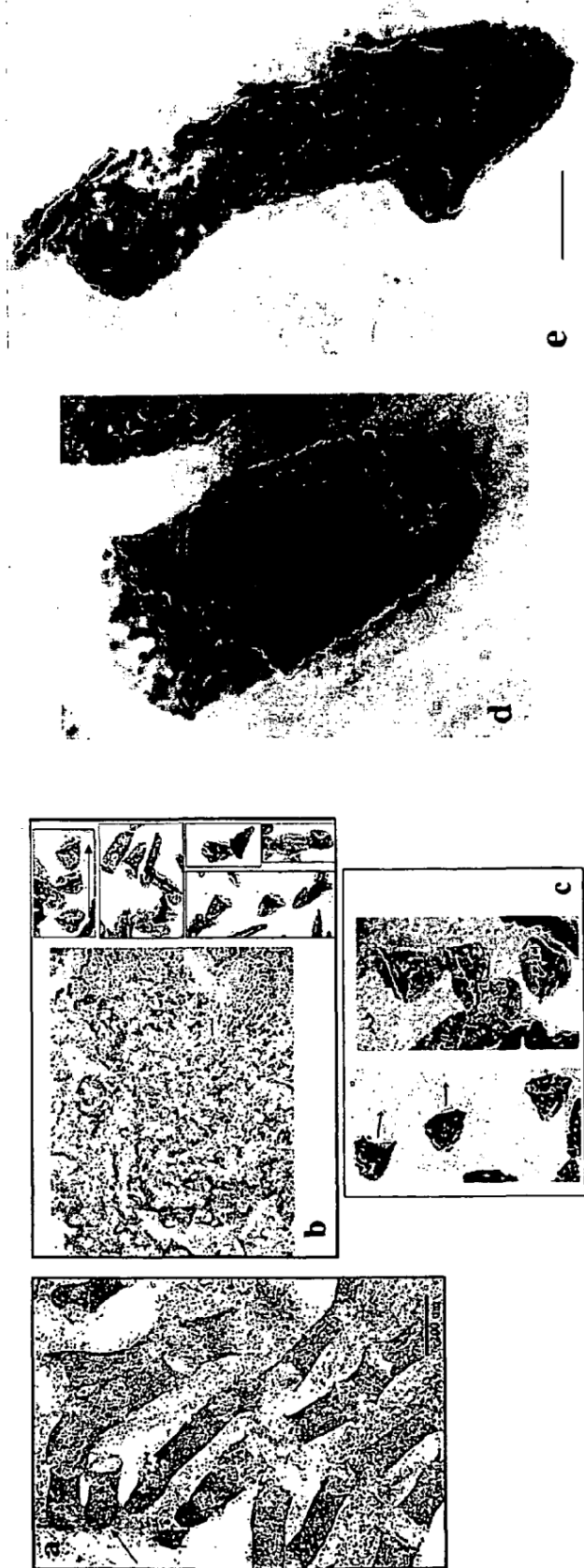


FIG. 6

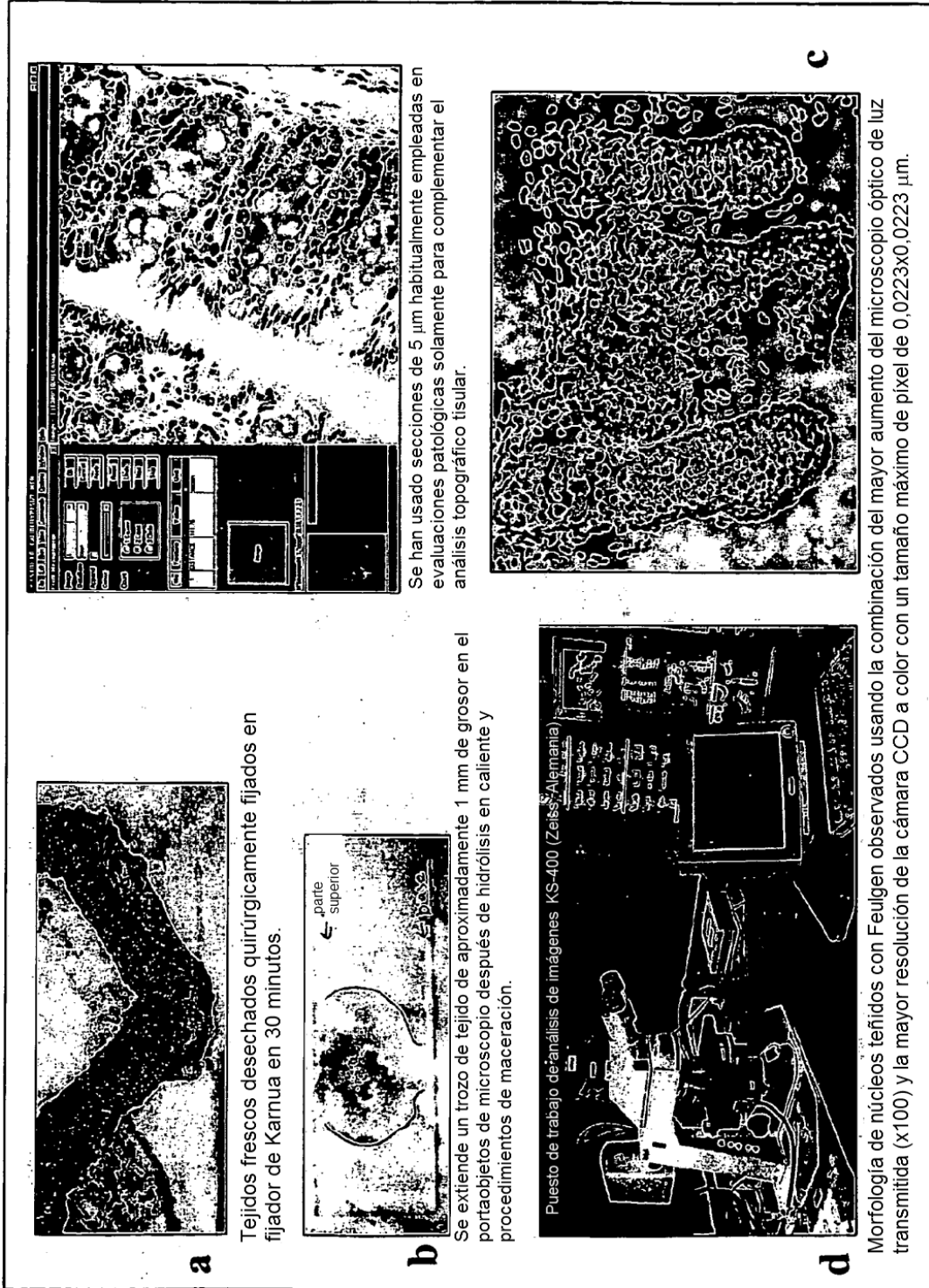


FIG. 7

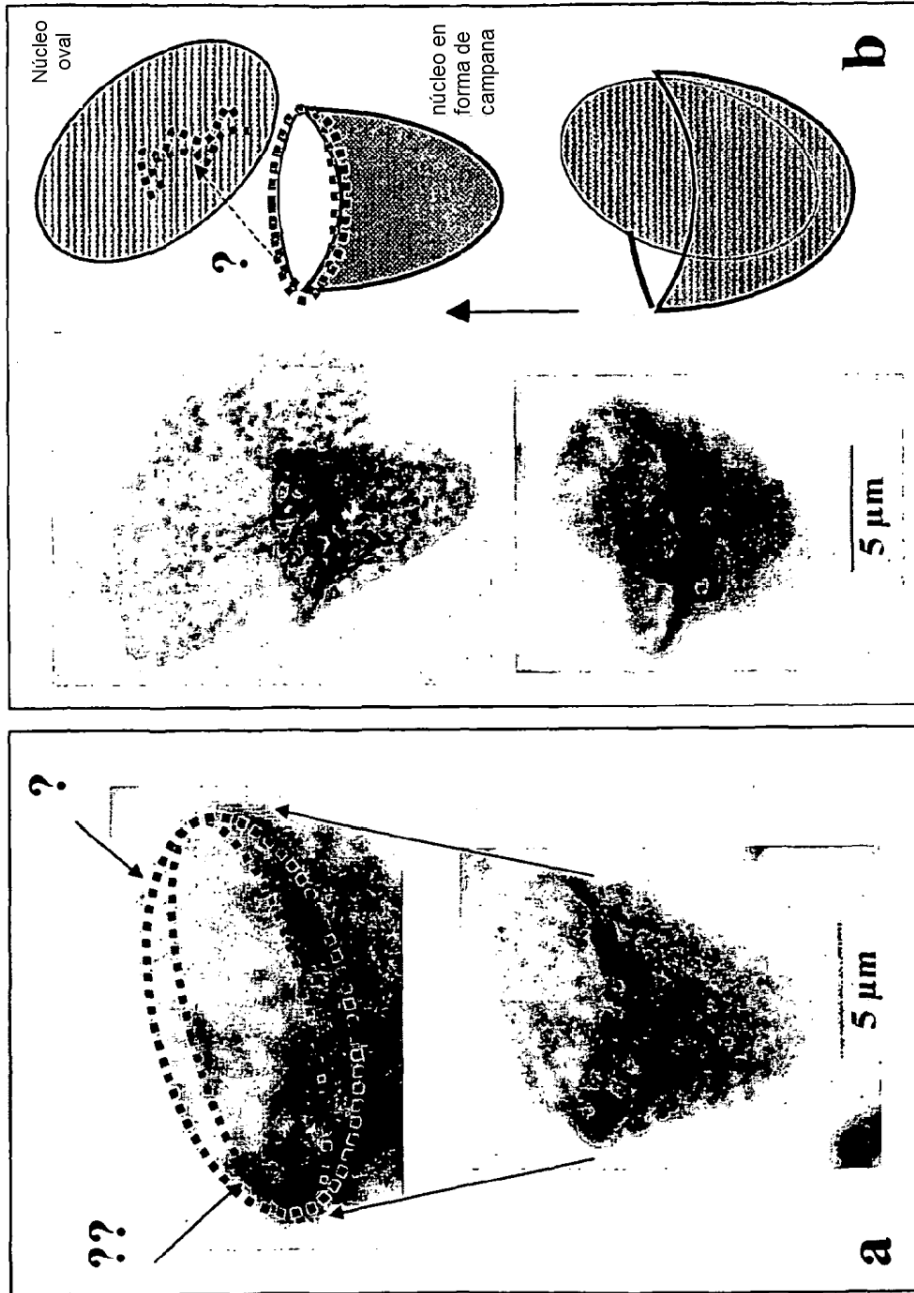


FIG. 8

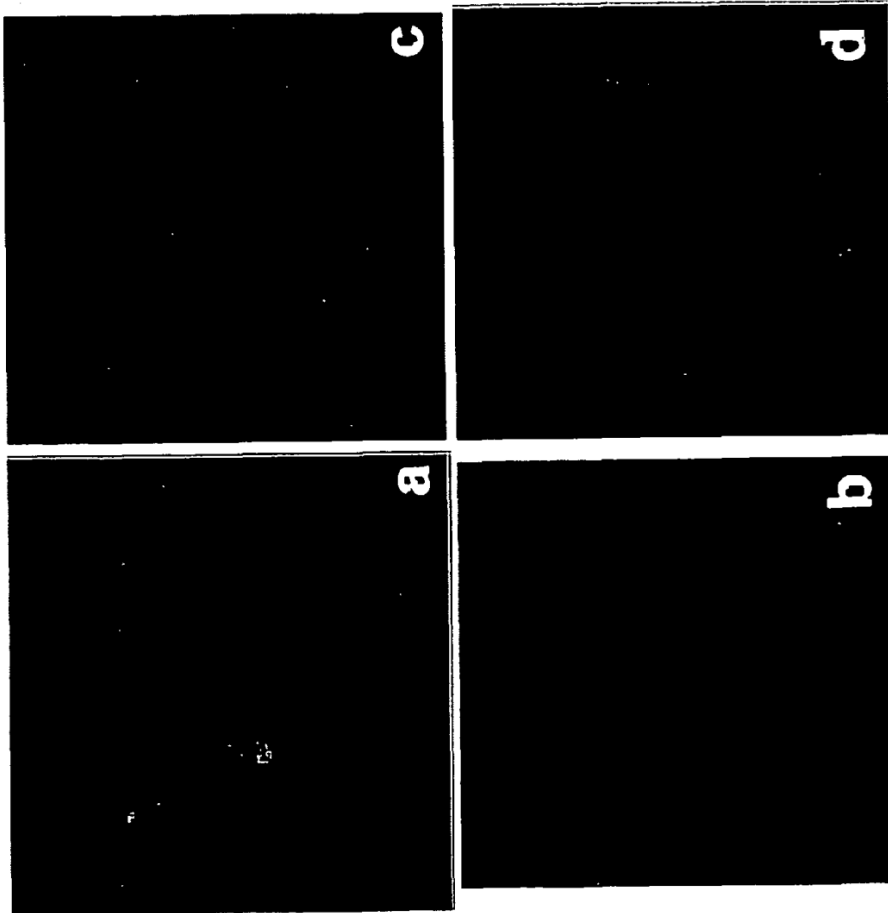


FIG. 9

Las fisiones nucleares en forma de campana crean sincitios:



Núcleo en forma de campana



par de núcleos en forma de campana morfológicamente idénticos



división parasincrónica de núcleos en forma de campana

FIG. 10

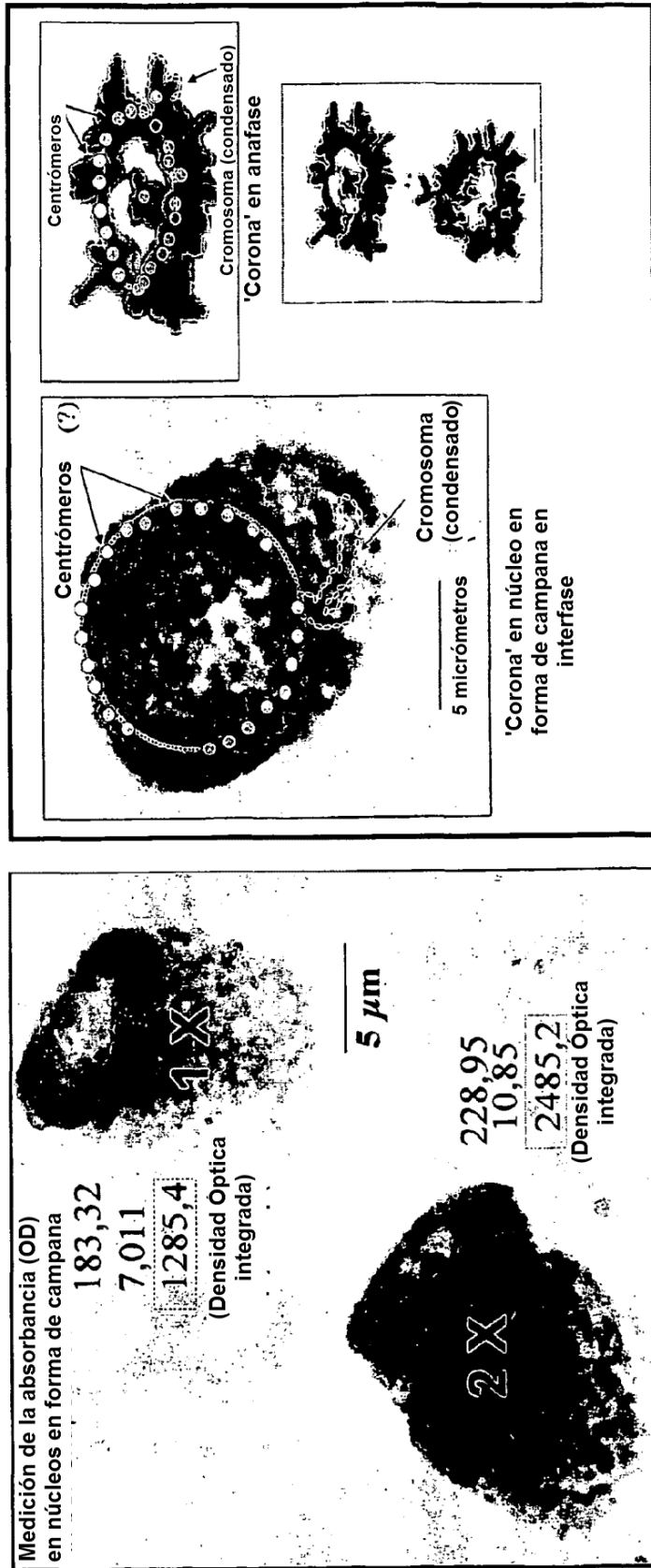


FIG. 11

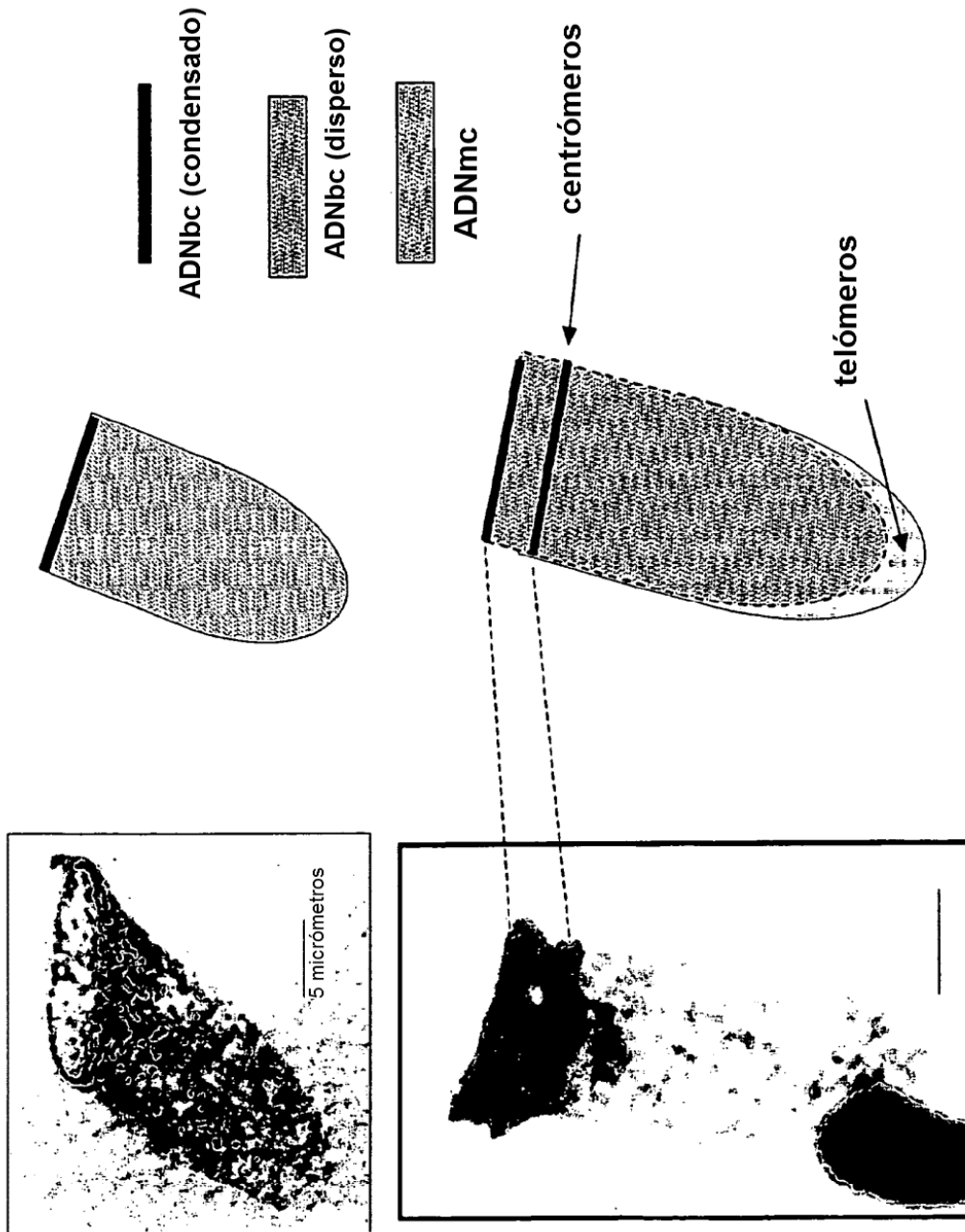


FIG. 12



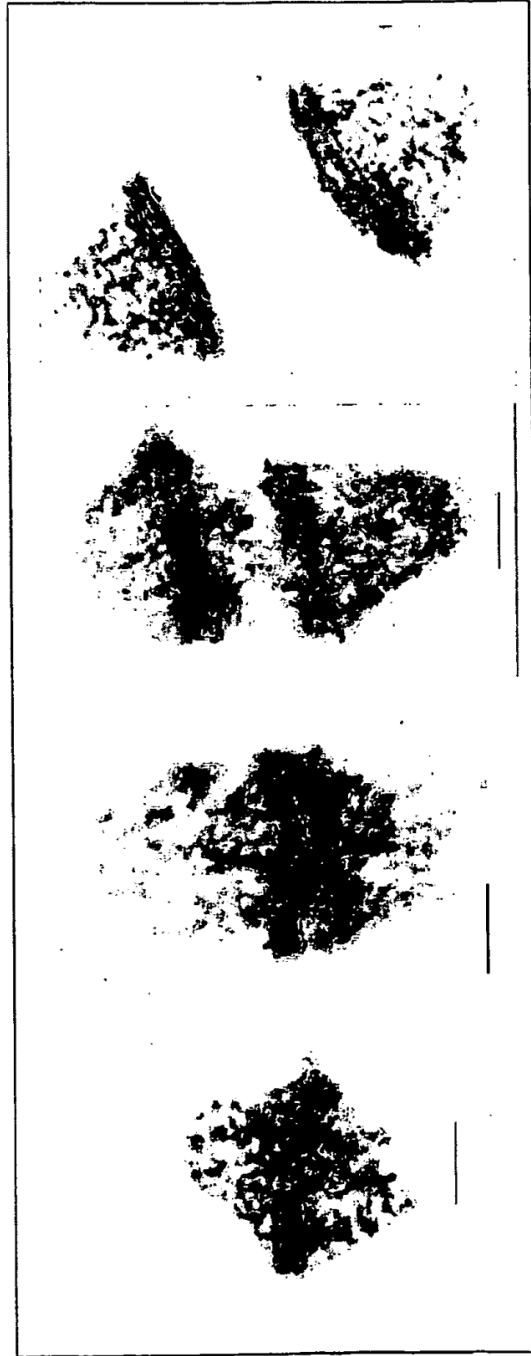


FIG. 13A      FIG. 13B      FIG. 13C      FIG. 13D



FIG. 14B

FIG. 14A

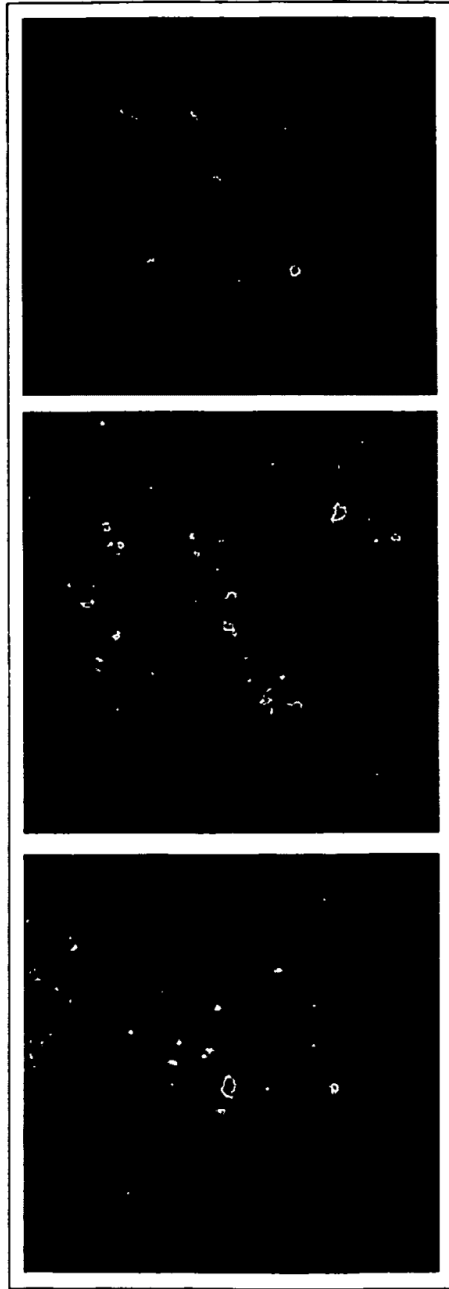


FIG. 15C

FIG. 15B

FIG. 15A



FIG. 16

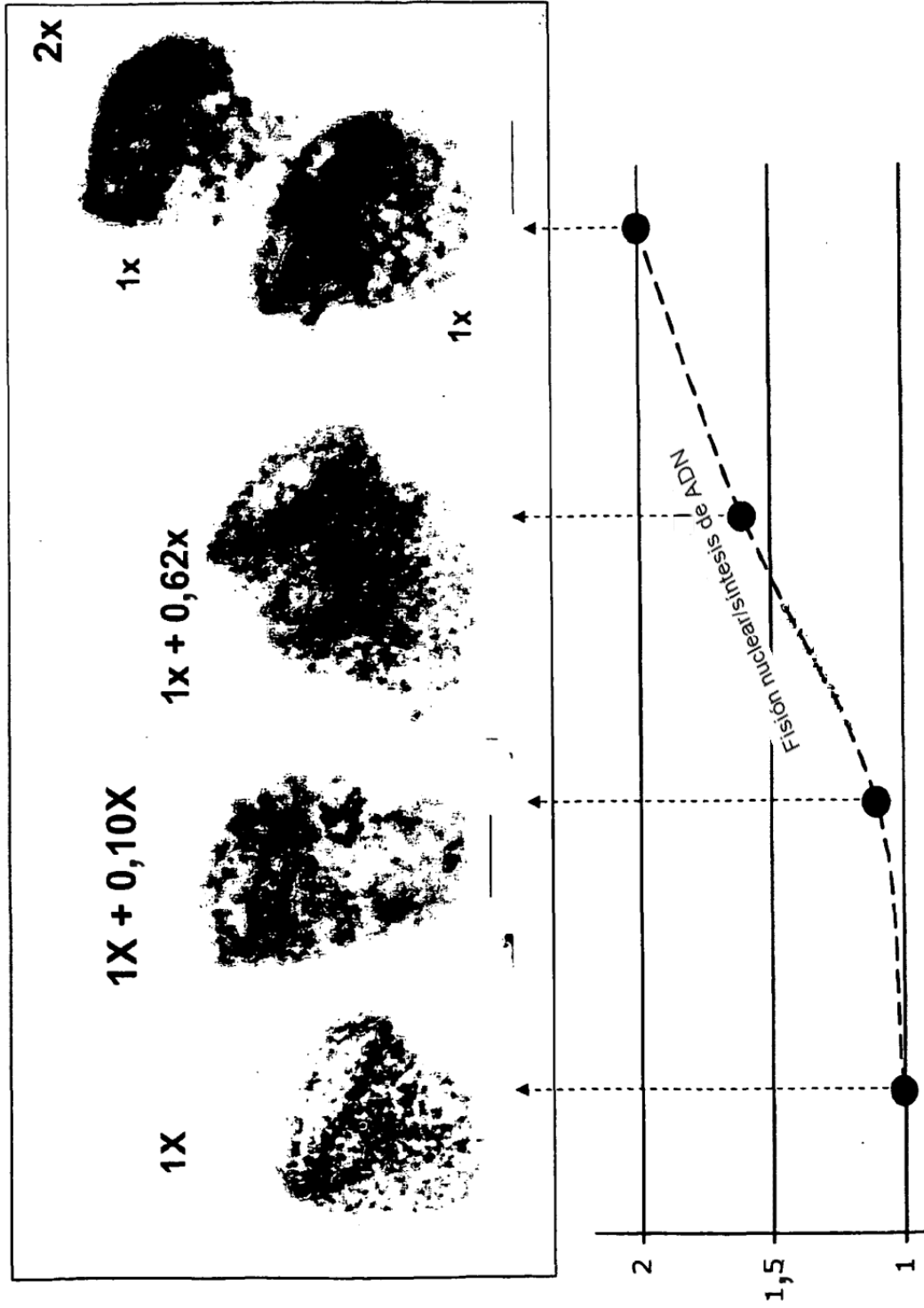


FIG. 17

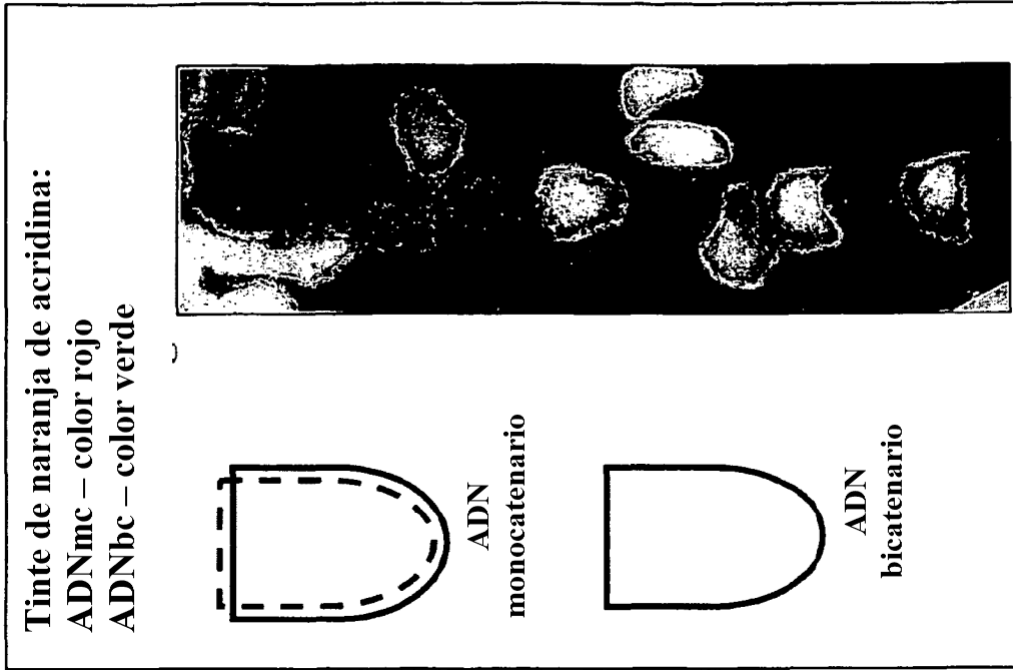


FIG. 18B

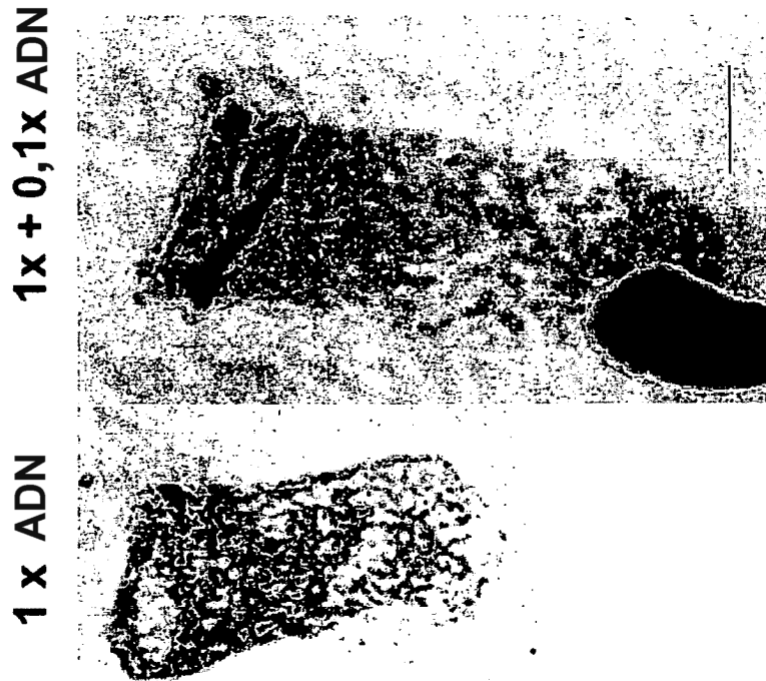


FIG. 18A

ENCONTRAR CÉLULAS MADRE, CREAR MUESTRAS HOMOGÉNEAS,  
IDENTIFICAR MOLÉCULAS DIANA, DISEÑAR FÁRMACOS.

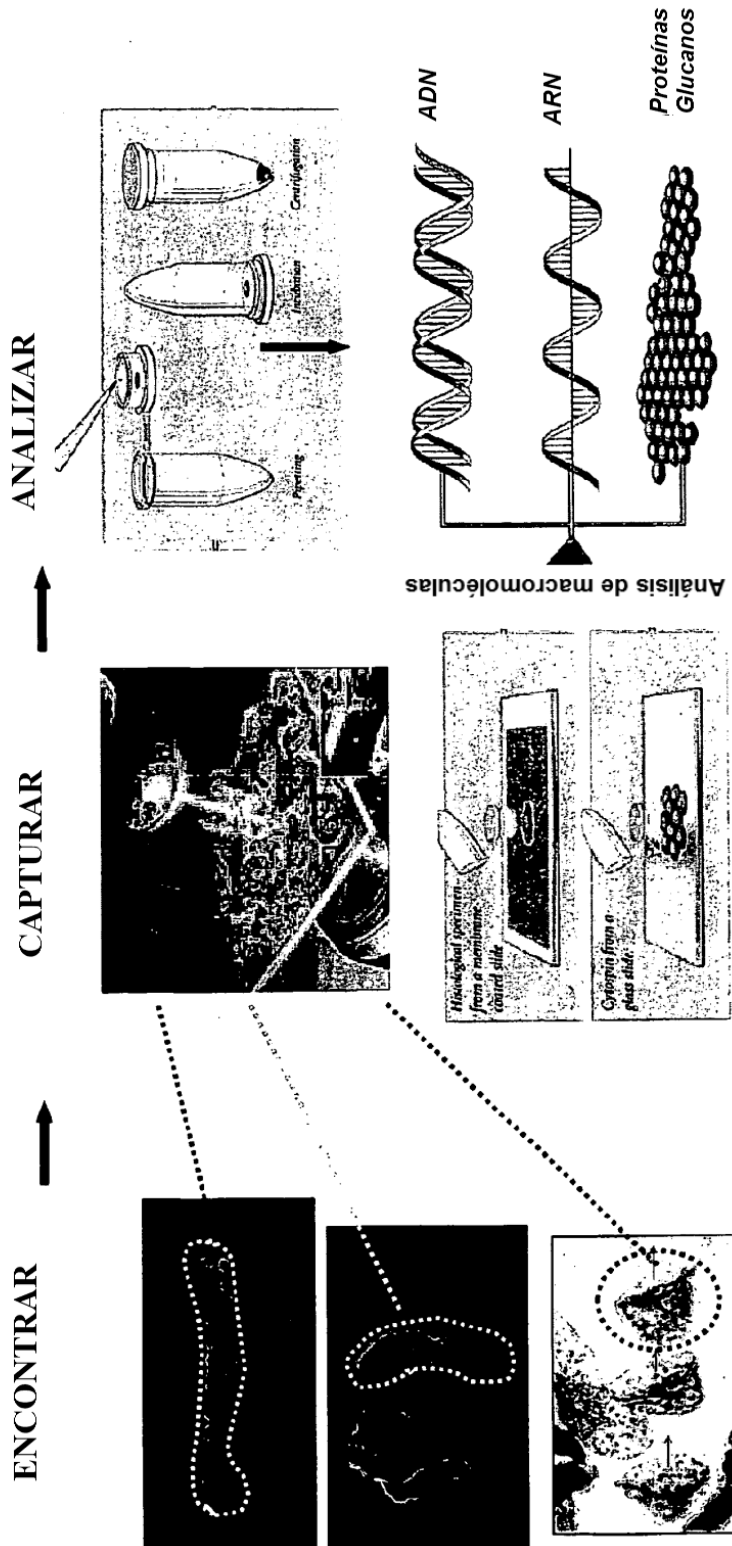
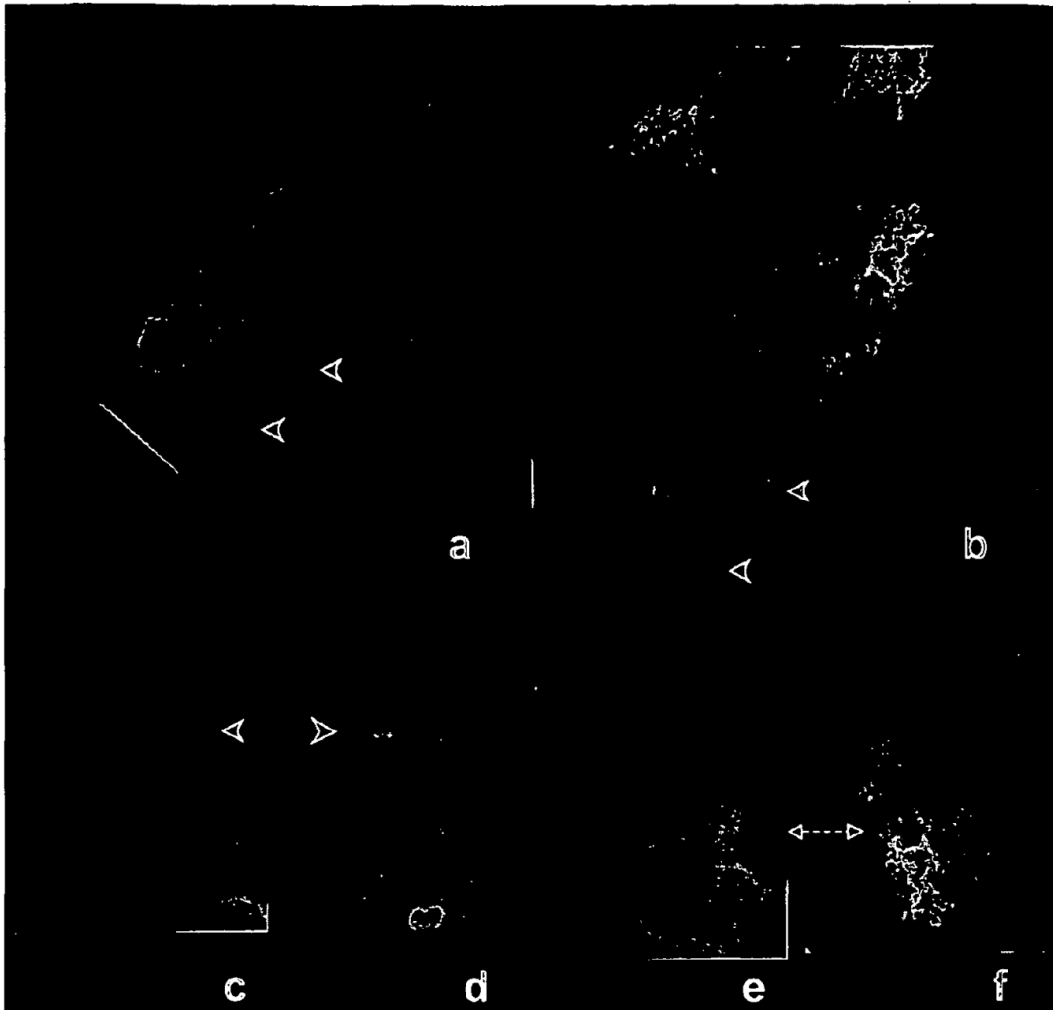


FIG. 19



5 **Figura 20.** Comparación paralela del patrón de intermedios de ADNmc en núcleos en forma de campana teñidos por naranja de acridina (ADNbc verde, ADNmc rojo) y anticuerpos contra ADNmc (núcleo en azul por DAPI, ADNmc en verde por FITC): a y c, el naranja de acridina revela 'anillos rojos' (cabezas de flecha) de ADNmc similar (cabezas de flecha) al que se observa en núcleos teñidos con anticuerpos contra ADNmc (b); e, f señal roja en tinción con naranja de acridina y señal verde en tinción con anticuerpos contra ADNmc (marcados con flecha) que muestran similitud en la distribución del ADNmc sobre el área completa del núcleo en forma de campana