

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 374**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/02** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**C12N 5/095** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2011 E 11842977 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2597952**

54 Título: **Método para aislar una célula cancerosa resistente a agentes quimioterapéuticos con propiedades de célula madre**

30 Prioridad:

**23.11.2010 US 458391 P**

**23.11.2010 US 458390 P**

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

**22.04.2015**

73 Titular/es:

**THE ROGOSIN INSTITUTE, INC. (100.0%)**  
**505 East 70th Street**  
**New York, NY 10021, US**

72 Inventor/es:

**GAZDA, LAWRENCE y**  
**SMITH, BARRY**

74 Agente/Representante:

**RUO, Alessandro**

**ES 2 534 374 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para aislar una célula cancerosa resistente a agentes quimioterapéuticos con propiedades de célula madre

**5 Solicitudes relacionadas**

**[0001]** La presente solicitud reivindica prioridad de las solicitudes de patente provisionales 61/458.390 y 61/458.391, presentadas ambas el 23 de noviembre de 2010, e incorporadas por referencia en su totalidad.

**10 Campo de la invención**

**[0002]** La presente invención se refiere a métodos para aislar células madre cancerosas. También se refiere a métodos para cribar compuestos de interés para determinar si tienen posible eficacia como agentes antitumorales.

**15 Antecedentes y estado de la técnica**

**[0003]** La mayoría de muertes por cáncer tras quimioterapia y remisión resultan de la reaparición del tumor tratado original o tumores. Esto parece ser algo contradictorio, ya que las terapias para el cáncer conocidas eliminan algunas veces, pero no siempre, tumores hasta tal punto que un paciente puede declararse "curado".

**[0004]** Una teoría que se ha adelantado para explicar la reaparición de tumores, además del crecimiento tumoral de por sí, es la teoría de la "célula madre cancerosa" o "CMC". En resumen, esta teoría plantea que una rara población de células cancerosas que poseen algunas características de células madre experimentan división asimétrica que a su vez conduce a células madre de sustitución, y a poblaciones de linaje más limitado de células amplificadoras de tumores. Estas "nuevas" células proliferan rápidamente, y constituyen la mayoría del tumor, a diferencia de las células madre, que son de ciclo lento, quiescentes, y son resistentes a terapias que se dirigen rápidamente a células en división. El resultado de esto es que mientras que la mayoría de las células en un tumor son susceptibles a una o más de estas terapias dirigidas, la pequeña población de células cancerosas quimiorresistentes similares a células madre no se destruyen, y se repite el ciclo tratado anteriormente.

**[0005]** Claramente, hay una necesidad de identificar estas células cancerosas similares a células madre, además de una necesidad de cuantificar su presencia en tumores de un sujeto particular o paciente. Por tanto, mientras que el campo de la oncología reconoce varias quimioterapias para el cáncer, "una talla no sirve para todos", y sigue existiendo la necesidad de desarrollar terapias dirigidas, además de un método más general para identificar fármacos antitumorales posiblemente útiles.

**[0006]** Las patentes de EE.UU. nº 5.888.497; 6.303.151; 6.808.705; 6.818.230; 7.041.504; y 7.297.331, todas las cuales se incorporan por referencia en su totalidad, describen métodos para encapsular células cancerosas en perlas de agarosa, que a su vez están recubiertas con agarosa. El tipo de agarosa puede variar, como se muestra en el contexto de otros tipos de células (islotas), como por, por ejemplo, la solicitud publicada 2007/0071732, también incorporada por referencia en su totalidad.

**[0007]** Los trabajos en estos encapsulados de células cancerosas ha conducido a la observación de que se desarrollan poblaciones de células que podrían poseer propiedades paralelas a las de las células madre. Así, era de interés determinar si los materiales descritos en estas referencias podrían usarse para aislar células cancerosas resistentes a la quimioterapia, que también poseyeran propiedades similares a células madre. Como resultado, también se aprendió que estos encapsulados podrían usarse para cribar compuestos de interés para determinar si el compuesto era eficaz contra cánceres.

**[0008]** Cómo se alcanzan estos y otros aspectos de la invención se observará en la siguiente divulgación.

**Descripción detallada de realizaciones preferidas****Ejemplo 1**

**[0009]** Se prepararon perlas de agarosa recubiertas con agarosa, que contenían células RENCA según Smith y col., Canc Res., 71(3): 716-724 (2011); y Smith y col., Canc. Res. 71(3): 725-735 (2011), cuyas divulgaciones se incorporan por referencia. Las perlas resultantes se cultivaron en medio durante 12 semanas.

**[0010]** A continuación, las muestras de perlas se expusieron a un único fármaco contra el cáncer conocido, a una de tres concentraciones variables. La exposición implicó la incubación de las perlas en presencia del fármaco durante un periodo de tiempo basado en la semivida conocida del fármaco.

**[0011]** Tras la incubación, las perlas se lavaron dos veces y se transfirieron a medio de cultivo sin tratamiento previo. También se prepararon controles, que incluyeron perlas sin tratar, además de perlas expuestas a cualquier vehículo usado para solubilizar el fármaco.

**[0012]** Se realizó el examen histológico de las perlas una semana tras la exposición al fármaco. En algunos casos, no hubo cambio, mientras que en otros, el fármaco produjo la pérdida completa de la viabilidad celular y en otros, y hubo un efecto intermedio. Los resultados son los siguientes:

Agente	Tiempo de tratamiento	Dosis	Efecto
Cisplatino	1 h	60 ng/ml	-
		600 ng/ml	-
		6000 ng/ml	-
Carboplatino	5 días	25 µg/ml	+/-
		250 µg/ml	+
		2500 µg/ml	+
Metotrexato	1 día	0,45 µg/ml	-
		4,5 µg/ml	-
		45 µg/ml	-
Doxorubicina	2 días	5 µg/ml	+
		50 µg/ml	+
		100 µg/ml	+
Vinorelbina	2 días	0,1 µg/ml	-
		1 µg/ml	+/-
		10 µg/ml	+/-
Docetaxel	1 día	0,5 µg/ml	+/-
		5 µg/ml	+/-
		50 µg/ml	+/-
Paclitaxel	1 día	0,35 µg/ml	-
		3,5 µg/ml	+/-
		35 µg/ml	+/-

5

### **Ejemplo 2**

**[0013]** El tratamiento con docetaxel y paclitaxel no destruyó todas las células dentro de las colonias de tumor encapsulado, y así las perlas que se habían tratado con estos fármacos se seleccionaron para estudio adicional. También podrían haberse usado perlas tratadas con carboplatino a una baja concentración, o vinorelbina, a una concentración intermedia.

**[0014]** Las perlas tratadas con paclitaxel y docetaxel se cultivaron bajo condiciones estándar, ya que fueron perlas de control que se habían expuesto a DMSO, que era el vehículo para la administración de los dos fármacos. El periodo de cultivo fue 18 semanas.

**[0015]** Las células encapsuladas en perlas tratadas con DMSO mostraron morfología normal, que es colonias de tumor elípticas, que consisten en un borde de células, 1-2 células de espesor, que rodea el residuo interno. A diferencia, las perlas que se habían tratado con 3,5 µg/ml de paclitaxel mostraron una pérdida de células durante 6 semanas, con un regreso al número previo al tratamiento de células en la semana 18. Las perlas tratadas con docetaxel (5 µg/ml) mostraron un patrón coherente de solo 1-2 células por colonia, 6 semanas después del tratamiento. Aproximadamente el 10 % de las perlas desarrollaron 1 ó 2 colonias grandes, en la semana 18.

**[0016]** Con el fin de cuantificar la pérdida de células, se seccionaron y se tiñeron perlas representativas de los grupos de control de DMSO, de paclitaxel y de docetaxel, usando métodos convencionales, con el fin de permitir el recuento de núcleos de células. Los resultados se normalizaron a las perlas tratadas con DMSO.

**[0017]** En el caso del tratamiento con paclitaxel, hubo una pérdida inicial durante las semanas 1-3 de aproximadamente el 25 % de células por colonia. La mayoría de las colonias contuvieron células viables. Los números de células habían aumentado después de 18 semanas para ser equivalentes a las perlas de DMSO de control. En el caso de perlas tratadas con docetaxel, éstas perdieron células viables muy rápidamente, de forma que solo 1-2 células viables estuvieron presentes en las colonias 6 semanas después del tratamiento. En la semana 18, aproximadamente el 10 % de las perlas habían desarrollado 1 ó 2 colonias grandes de células, indicando así que las células RENCA resistentes a docetaxel pueden formar nuevas colonias dentro de las perlas.

35

### **Ejemplo 3**

**[0018]** Pruebas evidentes sugieren que OCT4 ("factor de transcripción 4 de unión octámero"), un marcador para células madre embrionarias, puede usarse conjuntamente con otros factores de transcripción para inducir células adultas a un similar a células madre pluripotentes. Véase, por ejemplo, Park y col., Nature 451 (7475): 141-146 (2008). Pueden encontrarse marcadores adicionales característicos de células madre en, por ejemplo, International Stem Cell Initiative, y col., Nat. Biotechnol 25(7):803-16 (2007), incorporado por referencia en el presente documento.

40

[0019] Se llevaron a cabo experimentos para determinar si las células que permanecieron en las células tratadas con docetaxel, seis semanas después del tratamiento, mostraron este marcador.

[0020] Las células se tiñeron con DAPI, para identificar células vivas, mientras que se usaron procedimientos inmunoquímicos estándar para teñir OCT4, usando un anticuerpo policlonal de conejo para OCT4 y un anticuerpo de cabra anti-IgG marcada con un conjugado de Fluor 488.

[0021] Los resultados indicaron que las células vivas expresaron OCT4. La expresión, junto con la resistencia a docetaxel, sugiere que las células restantes son células madre cancerosas.

#### **Ejemplo 4**

[0022] Un requisito de las células madre cancerosas es la capacidad para formar colonias de células cancerosas. Para determinar si las células descritas arriba podrían actuar así, las colonias se desplazaron de las perlas, y se recogieron las células supervivientes, mediante rotura mecánica, 5-6 semanas después de la eliminación, y las colonias se trocearon con pinzas en RPMI 1640 más 10 % suero de bovino recién nacido. A continuación, la suspensión se pasó a través de un filtro de células de 40 µm, de manera que se minimizara cualquier residuo de agarosa, y se sedimentó mediante centrifugación. Se resuspendieron sedimentos de células, en medio de cultivo sin tratamiento previo, y se cultivaron tanto *in vitro* (200 células/ml, en RPMI 1640 complementado con 10 % suero de bovino recién nacido) como se cultivaron *in vivo*. Para la elaboración, se mezclaron 200 células con una gota de sangre de un ratón receptor, formando así un coágulo, que a continuación se implantó bajo una cápsula renal del ratón de la que se tomó la sangre. A continuación, los ratones se observaron para el crecimiento de tumores. El desarrollo de un tumor después del trasplante *in vivo* de células madre purificadas se considera el “estándar de oro” reconocido en la materia para identificar células madre cancerosas.

[0023] Las células RENCA cultivadas *in vitro* fueron mucho mayores que las células RENCA normales que se cultivaron en monocapa, y no se observó que experimentaran crecimiento celular durante aproximadamente 16 semanas. 16-17 semanas después del cultivo, las células formaron placas y empezaron a proliferar tras someterse a pases semanalmente, y cultivarse como una monocapa en cultivo. Pero dos semanas después del inicio del crecimiento de la monocapa, estas células tuvieron tasas de crecimiento que fueron comparables a las de las células RENCA normales, y aparecieron como células de monocapa RENCA normales, con tamaño y morfología equivalentes.

[0024] De los diez ratones que recibieron implantes, uno desarrolló un tumor bajo la cápsula, y murió 98 días después de la inducción. También desarrollo metástasis al pulmón.

[0025] Los resultados indican que estas células pueden así considerarse células madre cancerosas.

[0026] Los anteriores ejemplos exponen diversos aspectos de la invención, que incluyen un método para aislar células cancerosas que son resistentes a agentes quimioterapéuticos, tales como docetaxel, y que poseen una o más propiedades de células madre, tales como expresión de OCT4. Otras propiedades de células madre son muy conocidas para la materia y no se repiten aquí. El método implica encapsular una muestra de células cancerosas en una perla que contiene agarosa que luego se recubre con agarosa, cultivar la perla resultante para cultivar las células cancerosas contenidas en ella, poner en contacto la perla con un agente quimioterapéutico y determinar cuáles de dichas células restantes expresan OCT4, tanto *in situ* como por eliminación de las mismas.

[0027] Este método puede usarse, por ejemplo, para desarrollar un pronóstico para un sujeto que padece cáncer, debido a que, como se ha indicado anteriormente, las células del tipo descritas en el presente documento son responsables de la reaparición del cáncer en sujetos. Esencialmente, un alto porcentaje de dichas células indica un peor pronóstico para un paciente que sería el caso de un paciente que presenta pocas, o ninguna de tales células, en la muestra encapsulada.

[0028] Puede usarse cualquier agente quimioterapéutico en el método de la invención, como cualquier tipo de cáncer. El experto conocerá muchos otros agentes terapéuticos conocidos para la terapia contra el cáncer. De manera similar, se reconocerá que, a partir de, por ejemplo, las referencias citadas anteriormente, pueden usarse diversos cánceres y agarosas, además de los descritos en el presente documento.. Por tanto, las perlas de la invención pueden incluir materiales tales como colágeno, u otros materiales compatibles con agarosa. Las células cancerosas son preferentemente células de mamífero, y lo más preferentemente células humanas.

[0029] El hecho de que las células aisladas sean resistentes a los agentes quimioterapéuticos conocidos informados en el presente documento no significa, sin embargo, que sean “de por sí” quimiorresistentes. Los agentes probados en el presente documento, como se indica, son fármacos que son útiles, generalmente, en la destrucción de células que proliferan rápidamente. Hay otras terapias disponibles para las células del tipo representado por las células que quedan en las perlas de agarosa recubiertas con agarosa, que serán conocidas para el experto. Aunque no se informa en el presente documento, tales fármacos pueden probarse contra estas células que expresan OCT4 quimioterapéuticamente resistentes similares a células madre, y puede desarrollarse

una pauta terapéutica en la que, por ejemplo, un sujeto recibe, como primer ciclo de terapia, un agente antineoplásico estándar, seguido de un agente dirigido al tipo de células aisladas y descritas en el presente documento. Tales células son células cancerosas aisladas que son resistentes a agentes quimioterapéuticos, tales como docetaxel, y que expresan OCT4. En este aspecto de la invención, la sustancia de interés puede probarse  
5 contra las células cancerosas similares a células madre que quedan después del contacto con el primer agente, o pueden encapsular una muestra separada de células cancerosas similares a células madre y proceder del mismo modo.

**[0030]** El experto también observará que la invención se refiere a un método para determinar si un compuesto de  
10 interés tiene eficacia como agente antineoplásico. Como se observará, el método implica poner en contacto un compuesto de interés con una perla de agarosa recubierta con agarosa que contiene una muestra de células cancerosas, durante un periodo de tiempo elegido y a una concentración elegida, y determinar si dicho compuesto destruye un porcentaje de células superior a un control. En tales casos, el compuesto puede considerarse que es  
15 terapéuticamente útil, además de útil, en contextos no terapéuticos, tales como su uso en destruir células cancerosas en una población de células mixtas, o en eliminar células cancerosas no de células madre de una mezcla de células. También se contemplan “mezclas” de más de un agente terapéutico posiblemente útiles, o combinaciones de agentes terapéuticos conocidos con compuestos de prueba, para determinar si la terapia de combinación o aplicación en contextos no terapéuticos es apropiada.

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Un método para aislar una célula cancerosa resistente a agentes quimioterapéuticos con propiedades de célula madre, que comprende:
- (i) encapsular una muestra de células cancerosas en una perla que contiene agarosa recubierta con agarosa;
  - (ii) poner en contacto dicha perla con al menos un agente quimioterapéutico contra el cáncer durante un tiempo suficiente para destruir al menos una porción de dichas células cancerosas;
  - (iii) eliminar cualquier célula superviviente de dicha perla;
  - 10 (iv) ensayar dicha célula superviviente para al menos una propiedad de célula madre, y
  - (v) aislar cualquier célula que presente dicha propiedad de célula madre de cualquier célula que no.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en el que dicha propiedad de célula madre es expresión de OCT4.
- 15 **3.** El método de la reivindicación 1, en el que dicho agente quimioterapéutico es docetaxel.
- 4.** El método de la reivindicación 1, en el que dichas células cancerosas son células de mamífero.
- 5.** El método de la reivindicación 4, en el que dichas células de mamífero son células humanas.
- 20 **6.** Un método para determinar si una sustancia de interés tiene eficacia contra el cáncer, que comprende poner en contacto dicha sustancia con una muestra de células cancerosas encapsuladas en una perla recubierta con agarosa que contiene agarosa y comparar el porcentaje de dichas células cancerosas destruido por dicha sustancia con el porcentaje de dichas células cancerosas encapsuladas en una perla recubierta con agarosa que contiene agarosa
- 25 no puestas en contacto con dicha sustancia, en el que un mayor porcentaje destruido por dicha sustancia es indicativo de eficacia contra el cáncer para dicha sustancia.
- 7.** El método de la reivindicación 6, en el que dichas células cancerosas son células cancerosas de mamífero.
- 30 **8.** El método de la reivindicación 7, en el que dichas células cancerosas de mamífero son células cancerosas humanas.
- 9.** El método de la reivindicación 6, en el que dichas células cancerosas son células madre cancerosas.
- 35 **10.** El método de la reivindicación 6, que comprende además poner en contacto dicha sustancia con dicha muestra de células cancerosas a una concentración predeterminada y un periodo de tiempo predeterminado, determinar el porcentaje de dichas células cancerosas destruido por dicha sustancia y comparar dicho porcentaje con el porcentaje de dichas células cancerosas encapsuladas en una perla recubierta con agarosa que contiene agarosa destruido por un agente de control, en el que un mayor porcentaje destruido por dicha sustancia es indicativo de
- 40 eficacia contra el cáncer para dicha sustancia.
- 11.** El método de la reivindicación 10, en el que dichas células cancerosas son células madre cancerosas.