

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 929**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

C12N 5/095 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2008 E 08851705 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2212699**

54 Título: **Métodos para identificar, purificar y enriquecer células madre o inmaduras de inicio de cáncer a partir de tumores y uso de las mismas**

30 Prioridad:

20.11.2007 US 996483 P

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

19.05.2015

73 Titular/es:

**HOPITAUX UNIVERSITAIRES DE GENÈVE
(50.0%)**

**24, rue Micheli-du-Crest
1211 Geneva 4 , CH y
UNIVERSITE DE GENEVE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RADOVANOVIC, IVAN y
CLEMENT, VIRGINIE**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 535 929 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).

MÉTODOS PARA IDENTIFICAR, PURIFICAR Y ENRIQUECER CÉLULAS MADRE O INMADURAS DE INICIO DE CÁNCER A PARTIR DE TUMORES Y USO DE LAS MISMAS

DESCRIPCIÓN

5

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a métodos para la preparación de composiciones celulares, a composiciones aisladas que pueden obtenerse a partir de los mismos, a composiciones celulares aisladas relacionadas, a kits y al uso de las mismas. Más específicamente, la presente divulgación proporciona un método para identificar, purificar y enriquecer células madre o inmaduras de inicio de cáncer en una muestra. Las composiciones celulares, los métodos relacionados y los usos según la presente divulgación son útiles en el tratamiento de cánceres y/o la detección de enriquecimiento de células madre o inmaduras de inicio de cáncer, especialmente cánceres del sistema nervioso central y periférico y metástasis del cerebro.

15

Antecedentes de la invención

Los tumores cerebrales-gliomas son los tumores cerebrales más frecuentes en adultos y, en su forma maligna, (glioblastoma multiforme o de grado IV) siguen siendo una de las enfermedades más agresivas con una tasa de supervivencia a los 5 años de menos del 5% (Reardon *et al.*, 2006, J. Clin. Oncol., 24, 1253). Los gliomas se clasifican en subcategorías según su semejanza fenotípica con células gliales, principalmente con astrocitos (astrocitomas) y oligodendrocitos (oligodendrogliomas). Basándose en las características histopatológicas, los gliomas también se subdividen en tumores de bajo grado (grado I y II) y de alto grado (grado III y IV), que tienen distinto pronóstico clínico (Reardon *et al.*, 2006, citado anteriormente). Pese a los avances actuales en técnicas quirúrgicas, así como en estrategias de radiación y quimioterápicas, los gliomas de alto grado siguen siendo una enfermedad devastadora con pésimo pronóstico. No se han identificado factores de riesgo medioambientales y se sabe poco sobre los mecanismos biológicos implicados en las fases de inicio y progresión de estos tumores cerebrales. Por tanto, cualquiera mejora significativa en la terapia y profilaxis de gliomas requiere una comprensión más profunda de los mecanismos celulares y moleculares del desarrollo de gliomas.

30

La reciente identificación de células de tipo madre (SC) en varios cánceres humanos como leucemias mieloides agudas (LMA), tumores de mama, ovario y cerebro, tiene renovado interés en la hipótesis de que pueden surgir cánceres de mutaciones somáticas en células madre/progenitoras adultas (Reya *et al.*, 2001, Nature, 414, 105). Una población minoritaria de células de tipo madre pueden representar el origen de la expansión, recidiva y metástasis de células tumorales, determinando por tanto el comportamiento biológico de los tumores incluyendo proliferación, progresión y posterior respuesta a la terapia (Reya *et al.*, 2001, citado anteriormente; Galmozzi *et al.*, 2006, Curr. Med. Chem., 13, 603). Aunque las células madre normales y cancerosas comparten similitudes de comportamiento incluyendo autorrenovación, diferenciación en múltiples linajes, pueden diferir con respecto a su potencial tumorigénico cuando se implantan en ratones desnudos (Bonnet y Dick, 1997, Nat. Med. 3, 730). Además, es extremadamente complejo identificar marcadores de células madre cancerosas en gliomas humanos que sean específicos para regir los fenotipos tumorales. Se están realizando muchos esfuerzos para encontrar y caracterizar marcadores específicos de células madre cancerosas, que las discriminen de células cancerosas (marcadores de células del volumen tumoral) o de células madre normales. Hasta ahora, la expresión de CD133 era la única posibilidad de purificar y enriquecer una subpoblación de células madre de glioma que muestran propiedades tumorigénicas y de autorrenovación (Singh *et al.*, 2004, Nature, 432, 396). Aunque se describió CD133 en otros sistemas tumorigénicos, también se expresa en células madre normales, dificultando la selección como diana específica de células cancerosas para agentes terapéuticos (Yin *et al.*, 1997, Blood, 90, 5002; Uchida *et al.*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 14720; Miraglia *et al.*, 1998, Blood, 91, 4390). Además, es extremadamente difícil creer que sólo un marcador sería suficiente para definir "la población de células madre de glioma" conociendo la heterogeneidad de las poblaciones de células tumorales y el conocimiento actual del sistema hematopoyético.

50

Por tanto, existe la necesidad de nuevos métodos que permitan una mejor estrategia de selección para la comprensión adicional de las jerarquías celulares en gliomas y otros cánceres sólidos, especialmente de nuevos métodos para aislar y caracterizar completamente células de inicio y propagación de tumores que muestran propiedades de células madre, que pueden ser útiles en el tratamiento de tales cánceres.

55

Sumario de la invención

La presente divulgación se refiere a métodos para la preparación de composiciones celulares, a composiciones aisladas que pueden obtenerse a partir de los mismos, a composiciones celulares aisladas relacionadas y al uso de las mismas y a métodos para identificar, purificar y enriquecer células madre o inmaduras de inicio de cáncer en una muestra.

60

Un primer aspecto de la divulgación proporciona un método para la preparación de una composición celular según la divulgación y composiciones aisladas que pueden obtenerse a partir del mismo.

65

Un segundo aspecto de la divulgación se refiere a una composición celular aislada que comprende células vivas que presentan una emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser se aíslan mediante clasificación celular activada por fluorescencia.

5 Un tercer aspecto de la divulgación se refiere a una composición celular aislada que comprende células vivas que presentan un ligero cambio positivo en la fluorescencia detectada en el canal FL3 y/o FL4 mediante clasificación celular activada por fluorescencia.

10 Un cuarto aspecto según la divulgación reside en un kit que comprende al menos una composición celular según la divulgación.

Un quinto aspecto según la divulgación se refiere a un uso de una composición celular aislada según la divulgación en métodos de selección según la invención y métodos relacionados.

15 Un sexto aspecto según la divulgación se refiere a un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células.

20 Un séptimo aspecto según la divulgación se refiere a métodos de selección para seleccionar agentes antitumorales para determinar agentes que puedan desplazar las células desde un estado tumorigénico hasta un estado no tumorigénico.

Un octavo aspecto según la divulgación se refiere a un método de detección de recidiva de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas.

25 Un noveno aspecto según la divulgación se refiere a un ensayo de selección que comprende o que usa una composición celular según la divulgación.

Descripción de las figuras

30 La figura 1 representa un esquema para un método según la invención. (a) Proporcionar una muestra reciente a partir de la muestra de células tumorales tras disociación. (b) Cultivar opcionalmente las células proporcionadas en (a) en un medio de cultivo. (c) Aislar en una submuestra las células que presentan emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a una longitud de onda de o de aproximadamente 488 nm mediante clasificación celular activada por fluorescencia, a partir de las células proporcionadas en la etapa (a) o (b).
 35 (d) Aislar en otra submuestra mediante clasificación celular activada por fluorescencia las células que no fluorescen en la etapa (c) y que presentan un ligero cambio positivo en la fluorescencia detectada en el canal FL3 y/o FL4. (e) Excluir las células muertas de cada una de las submuestras de células aisladas obtenidas en las etapas (c) y (d). (f) Reunir la submuestra de células obtenida en la etapa (c) tras el tratamiento en la etapa (e). (g) Reunir la submuestra de células obtenida en la etapa (d) tras el tratamiento en la etapa (e).

40 La figura 2 muestra que las células FL1⁺ tienen propiedades esferogénicas mayores que las células FL1⁰, y capacidad de autorrenovación exclusivamente a largo plazo. (A) Porcentaje de unidades esféricas secundarias formadas tras clasificación de FL1⁺ y FL1⁰, y clonación a 1 célula/pocillo. Recuento de esferas evaluado a los 10 días tras la clonación. (B) Pases en serie (hasta cinco) de clones individuales derivados de una única célula FL1⁺ o de una única célula FL1⁰. Mientras que pueden realizarse más de 5 pases de los clones positivos para FL1, la mayoría de los clones de FL1⁰ ya no forman esferas tras 4 pases. (C) Imágenes de contraste de fases de dos clones individuales a lo largo de pases en serie. Panel izquierdo: morfología de los clones de FL1⁺ y FL1⁰. Mientras que el clon de FL1⁺ es una esfera, el clon de FL1⁰ consiste en células unidas, aunque ambos clones se cultivaron en condiciones de células madre. Panel derecho: fotografías a menor ampliación de la evolución y el crecimiento de clones individuales tanto de FL1⁺ como de FL1⁰ hasta el pase 4. Las leyendas del tipo de muestra de tumor están en la figura 9A.

50 La figura 3 muestra un análisis celular realizado en una muestra reciente tal como se describe en el ejemplo 1 (A): población completa, (B): FL1⁺; C: FL1⁰. La autofluorescencia se emite específicamente en el canal FL1 (515 +/-5 nm o 530 +/-15 nm). Los puntos de color gris claro separan células FL1⁺ viables con perfiles de baja SSC y alta FCS (P1). Los puntos de color gris oscuro separan células FL1⁰ viables con una morfología diferente (perfiles de baja/media SSC y FSC; P2). P4 y P5 separan células FL1⁺ y FL1⁰ respectivamente con bajos niveles de fluorescencia (<10²). P6 representa una pequeña población con baja SSC y FSC, que sólo se detecta en una muestra humana primaria reciente o en tejido de ratones que portan tumores. Los puntos de color negro representan la amplia población no separada que no sigue ningún otro criterio e incluye células muertas.

60 La figura 4 muestra un análisis celular realizado en células cultivadas en condiciones de células madre tal como se describe en el ejemplo 2. (A) Población de células completa. Sin separación. (B1-B3) R1, células viables potenciales. (C1-C3) Niveles de autofluorescencia en los canales FL1-H, FL2-H, FL3-H, respectivamente. R2, FL1⁰ viables, C1: morfología de FL1⁰, C2: nivel de fluorescencia de FL1⁰ sin azul de tripano, C3: nivel de fluorescencia de FL1⁰ tras adición de azul de tripano. (D1-D3) R3, FL1⁺ viable. D1: Morfología de FL1⁺, D2: nivel de fluorescencia de FL1⁺ sin

azul de tripano, D3: nivel de fluorescencia de FL1⁺ tras adición de azul de tripano. R6: Células muertas (en población separada de R1). R7: células viables FL1⁰ (en población separada de R1). R8: FL1⁺ viables (en población separada de R1). Se observan los resultados siguientes: el 93,3% de las células separadas R1 son viables, entre las cuales el ~21% son células viables FL1⁺, ~ el 23% son células viables FL1⁰.

5 La figura 5 muestra células FL1-H, aisladas tal como se describe en el ejemplo 2, enriquecimiento para expresión génica de capacidad de células madre y niveles de proteínas medidos tal como se describe en el ejemplo 3. (A) Razón de los niveles de expresión génica detectados en células FL1-H con respecto a los de células distintas de FL1-H. Muestras analizadas mediante PCR cuantitativa en tiempo real y normalizadas con media geométrica de los niveles de expresión de GAPDH, TUBG1 y EEF1A. nd (no determinado): en ambos casos, no se detectaron niveles de expresión génica en la población de células distintas de FL1-H. Fotografías de gel de PCR representativas de los niveles de expresión génica para las quintas muestras que muestran enriquecimiento constante en la población de células FL1-H (panel A, izquierda). (B) Análisis del ciclo celular de células FL1⁺ y FL1⁰ tras clasificación FACS y tinción con yoduro de propidio (PI) (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). La mayoría de las células FL1-H están en la fase de ciclo celular S, mientras que la mayoría de las células FL1⁰ están en fase G1. Esto se correlaciona parcialmente con la ausencia de actividad metabólica detectada en células FL1⁰ en el panel D. (C) Actividad metabólica de células FL1⁺ y FL1⁰ tras clasificación por los niveles de autofluorescencia y ensayos colorimétricos (MTS). Los valores representan la densidad óptica (DO) detectada a 490 nm. Se usaron células 293T como control positivo mientras que como control negativo se usaron sólo medios.

20 La figura 6 muestra que las células FL1⁺ inician y mantienen el crecimiento tumoral *in vivo*. (A) Obtención de imágenes *in vivo* y análisis histológicos de ratones en los que se implantaron células clasificadas FL1⁺ o FL1⁰ (se implantaron 10⁵ células), tal como se describe en el ejemplo 3. Imágenes en secuencia representativas de ratones con implante de cerebro con obtención de imágenes mediante resonancia magnética (IRM) antes (T2) y después de contraste (T1+ gadolinio). Tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de cortes de cerebro implantados (2,5x) y a ampliación superior (20x). La autofluorescencia de FL1-H (gris claro) y colocalización con MHC1 permiten la identificación de las células tumorales de origen humano (10x). (B) Análisis de expresión de células que expresan GFAP, NESTIN, TUJ1, Ki67 en los ratones en los que se implantaron FL1. Núcleo teñido con Dapi (azul). Barra de escala: μm . (C) Fotografías de gliomaesferas derivadas de ratones en los que se inyectaron FL1⁺ y FL1⁰. Se disociaron el lado inyectado y el contralateral del cerebro de ratón que portaba tumores y se analizaron mediante FACS para determinar los niveles de autofluorescencia de FL1-H antes del cultivo *in vitro*. El cultivo celular derivado del lado contralateral de ratones en los que se inyectó FL1⁺ reveló la formación de gliomaesferas, FL1⁺, indicando la capacidad de migración de FL1⁺. Barra de escala: μm . (D) Tabla resumen del número de ratones desnudos en los que se implantaron células clasificadas FL1⁺ y FL1⁰ a partir de diversos cultivos de gliomaesferas (N=24 y N=23 respectivamente). (E) La tabla muestra el número de ratones desnudos en los que se implantaron células clasificadas FL1⁺ y FL1⁰ aisladas prospectivamente (40³ células/ratón).

35 La figura 7 muestra que cultivos de células madre de glioma y tumor de glioma recientes contienen una población autofluorescente de FL1-H. (A) Análisis de FACS de células de GBM IV-2 primario cultivadas en diferentes condiciones de medios a partir de disociación tumoral. Panel superior: Células de GBM IV-2 primario cultivadas en condiciones de células madre, que albergan la presencia de una población de células FL1⁺. En contraposición, cuando las mismas células de GBM IV-2 primario se cultivaron inicialmente en condiciones enriquecidas en suero (panel central), no se observaron células autofluorescentes FL1⁺, en cambio se monitorizó una población de células homogéneas con una baja autofluorescencia mediante FACS. Se transfirieron las células de GBM IV-2 primario y se cultivaron desde medios enriquecidos en suero hasta medios de células madre durante 4 pases. Sin embargo, las células no recuperan ninguna autofluorescencia de FL1-H. Permanece una única población de células con bajos niveles de autofluorescencia de FL1-H, lo que sugiere que las células de GBM IV-2 primario han perdido irreversiblemente su población de FL1⁺ en suero. (B) Análisis de FACS de células de GBM IV-2 primario cultivadas en primer lugar en condiciones de células madre (panel superior) y después sembradas en placas para determinar la diferenciación en sustrato de poli-ornitina-laminina sin mitógenos durante 7 días (panel inferior). R2 separa el porcentaje de células positivas para FL1-H. La retirada de mitógenos únicamente o la siembra en placa en condiciones enriquecidas en suero (datos no mostrados) no son suficientes para suprimir la población de células autofluorescentes FL1⁺ a diferencia del ensayo de diferenciación. Las leyendas del tipo de muestra de tumor están en la figura 9A.

55 La figura 8 muestra la morfología y los niveles de fluorescencia en FL1 y FL3 tras adición de azul de tripano, el ciclo celular y fotografías de dos cultivos de gliomaesferas. (A) A.O.III-1 y (B) GBM-2 primario.

60 La figura 9 muestra la lista de tejidos humanos y sus cultivos de gliomaesferas derivados. (A) Lista de gliomas humanos usados en este estudio, clasificados según su tipo y grado. Se documentan la ubicación, el sexo y la edad para cada muestra (N=25). (B) Porcentaje de células autofluorescentes y media de la intensidad de FL1 en cultivos de gliomaesferas determinados mediante citometría de flujo (N=7). A: Astrocitoma; O.G: Oligodendroglioma; O.A: Oligo-astrocitoma; GBM: Glioblastoma multiforme; GSM: Gliosarcoma.

65 La figura 10 muestra el porcentaje de la población de FL1⁺ que permanece estable durante >10 pases en diversos cultivos de gliomaesferas. Aunque los porcentajes de células FL1⁺ varían ligeramente de unos pases a otros,

permanecen estables durante un largo periodo de tiempo en el GBM-2, -3, primario, GBM-1 secundario, y se enriquecen progresivamente en cultivos de O.A III-1 y GSM IV-1.

La figura 11 muestra la cuantificación de marcadores proteicos dentro de las gliomaesferas tras la reconstrucción 3D confocal. (A) El diagrama muestra el procedimiento para cuantificar y tabular la expresión y localización del marcador individual con la autofluorescencia de FL1 dentro de una gliomaesfera. Específicamente, el esquema izquierdo indica las secciones de pila Z tras microscopía confocal, lo que permite la tabulación de la expresión y localización de la proteína por superficie (eje X del gráfico izquierdo, paneles B a K). El esquema derecho representa la cuantificación de la expresión y localización de proteínas dentro de un sector de 6° para una superficie dada. El análisis de 60 sectores por superficie corresponde al eje X del gráfico derecho (sección centro de un plano) paneles B a K. (B-D) Cuantificación de los niveles de autofluorescencia de FL1 en 3 cultivos diferentes de gliomaesferas. Obsérvese la mayor intensidad de autofluorescencia de FL1 dentro de la esfera (gráfico izquierdo), y la expresión y localización heterogéneas por sector entre las diferentes superficies (gráfico derecho). (E-M) Cuantificación del nivel de expresión y localización de marcadores individuales dentro de gliomaesferas de GBM-3 primario (gráficos izquierdo y central). Porcentaje de células que expresan marcador dentro de células de GBM-3 primario no clasificadas (parte derecha superior), células clasificadas FL1⁺ (parte derecha central), células clasificadas FL1⁰ (parte derecha inferior). Los marcadores estudiados fueron: NANOG (E), OCT4 (F), SOX2 (G), KI67 (H), NOTCH1 (I), NESTIN (J), GFAP (K), PDGFR α (L), Integuin β 1 (M).

La figura 12 muestra que las células FL1⁺ y FL1⁰ pueden diferenciarse dando diferentes linajes neuronales. Se sembraron en placa células FL1⁺ y FL1⁰ purificadas a partir de gliomaesferas de GBM-2 primario para determinar la diferenciación durante 10 días. Se fijaron las células y se tiñeron para la determinación de GFAP, NESTIN, TUJ1 y MAP2. Obsérvese que las células FL1⁺ y FL1⁰ sí se diferencian en un grado similar, lo que indica su capacidad multipotente. Pocos islotes de células fueron positivos para GFAP (el 2-3% de las células). Se detectó un 1% de células positivas para TUJ1 con la inducción de diferenciación. Aunque los niveles basales y los porcentajes de células que expresan MAP2 o NESTIN fueron superiores en comparación con los de células que expresan GFAP y TUJ1, sólo el 10-15% de las células fueron altamente positivas para MAP2 o NESTIN. La flecha apunta a las células positivas. Barra de escala: 80 μ m.

La figura 13 muestra cómo pueden identificarse y aislarse poblaciones de células de glioma según un método según la invención basándose en su morfología y nivel de fluorescencia intrínseca (a una longitud de onda de excitación de 488 nm). (A) Células FL1⁺ que albergan una morfología específica y propiedades fluorescentes intrínsecas, lo que permite una identificación, purificación y caracterización rápida, no tóxica y robusta, en comparación con cualquier otra célula de glioma dentro de una muestra de glioma reciente y de cultivo. (B) Resumen de las propiedades de las células aisladas FL1⁺ y FL1⁰ según la invención.

La figura 14 representa un esquema para un método para detectar la recidiva de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas. Se indican las etapas (a), (b), (c), (i), (j), (k), (11)-(14) del método.

Descripción detallada

El término "muestra" comprende una muestra de tejido o fluido procedente de cualquier origen tal como una muestra de tejido o fluido de un paciente (tal como un paciente mamífero, más específicamente un paciente humano) que padece un cáncer o que se sospecha que padece un cáncer tal como por ejemplo gliomas, schwannomas, metástasis del cerebro, meningiomas y ependimomas humanos. En otra realización, la muestra comprende una muestra de tejido o fluido procedente de cualquier origen tal como una muestra de tejido o fluido de un paciente (tal como un paciente mamífero, más específicamente un paciente humano) que padece un cáncer metastásico o que se sospecha que padece un cáncer tal como por ejemplo metástasis del cerebro por melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón.

El término "muestra de células tumorales" comprende muestras de células recién disociadas de una muestra de tumor o de muestras de células en las que las células se han cultivado tras la disociación de una muestra de tumor, como por ejemplo cultivos de gliomaesferas tales como cultivadas en medio de células madre y similares, cultivos de células adherentes tales como cultivadas en medio rico en suero y similares y cultivos de células diferenciadas tales como cultivadas en medio de cultivo de diferenciación y similares. El término "medio de células madre y similares" incluye medio en el que se expanden células madre cancerosas (también denominadas gliomaesferas) derivadas de muestra de tejido recién disociado. Por ejemplo, el medio de cultivo de células madre neuronales incluye medio DMEM-F12 de Ham (Gibco) con aporte complementario de penicilina-estreptomocina a 1/1.000 (Gibco), B27 (1/50, Gibco) o BIT9500 (al 20%, Stemcell Technologies), EGF recombinante humano (20 ng/ml, Invitrogen) y FGF-2 básico (20 ng/ml, Invitrogen)).

El término "medio rico en suero y similares" incluye medio en el que se expanden cultivos adherentes derivados de una muestra de tejido recién disociado (por ejemplo el 10% de FBS, DMEM-F12 de Ham (Gibco) con aporte complementario de penicilina-estreptomocina a 1/1.000 (Gibco)).

El término "medio de cultivo de diferenciación y similares" incluye medio en el que se siembran en placa células

madre cancerosas para analizar sus capacidades multipotentes (por ejemplo placas recubiertas con una mezcla de poli-L-ornitina y laminina (sigma) diluidas 1:100 en H₂O durante la noche a 37°C. Las células se disocian y se siembran en placa a una densidad de 10 células/μl en DMEM-F12 de Ham (Gibco) con aporte complementario de penicilina-estreptomina a 1/1.000 (Gibco), B27 (1/50, Gibco) o BIT9500 (al 20%, Stemcell Technologies).

5 El término “medio de expansión” define un medio en el que las células se expanden *in vitro*, es decir en el que las células crecen, se dividen y dan lugar a células hijas mediante división asimétrica o simétrica.

10 El término “canal FL1” es el canal de fluorescencia de detección longitudinal tal como se describe en Practical Flow Cytometry, Shapiro *et al.*, 4ª edición, 2003, Wiley & Sons, Inc. Normalmente, para una longitud de onda de excitación de 488 nm, la detección de autofluorescencia se produce en el canal FL1 a una longitud de onda de o de aproximadamente 520 nm.

15 El término “canal FL3” es el canal de fluorescencia de detección lateral (45°) tal como se describe en Practical Flow Cytometry, Shapiro *et al.*, 4ª edición, 2003, Wiley & Sons, Inc. Normalmente, para una longitud de onda de excitación de 488 nm, la detección de autofluorescencia se produce en el canal FL3 a una longitud de onda > 630 nm.

20 El término “canal FL4” es el canal de fluorescencia de detección lateral tal como se describe en Practical Flow Cytometry, Shapiro *et al.*, 4ª edición, 2003, Wiley & Sons, Inc. Normalmente, para una longitud de onda de excitación de o de aproximadamente 632 nm o de o de aproximadamente 546 nm, la detección de autofluorescencia se produce en el canal FL4 a una longitud de onda > 630 nm.

25 El término “cáncer” comprende cánceres tales como un cáncer del sistema nervioso central y periférico, metástasis del cerebro y metástasis del pulmón, leucemias mieloides agudas (LMA), tumores de mama y ovarios. Además, el término cáncer comprende cánceres tales como melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon.

30 El término “células FL1⁺” o “células FL1-H” se refiere a células que se clasifican mediante clasificación celular activada por fluorescencia a través de un método según la invención, especialmente mediante la detección y clasificación selectivas de células que presentan una morfología específica (alta FSC y baja/media SSC) y emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser en una submuestra de células. Esta submuestra consiste en una subpoblación de células que presentan tal emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 que se detecta tras excitación a una longitud de onda de 488 nm (por ejemplo un haz de láser azul, por ejemplo argón) a una longitud de onda de aproximadamente 520 nm. Más específicamente, la autofluorescencia de FL1 puede detectarse en el canal FL1 con un espejo dicróico a 530 nm +/-15, y más estrechamente con un espejo dicróico a 515 nm +/-5, lo que confirma la especificidad del espectro de emisión de autofluorescencia de FL1.

40 El término “células FL1⁰” o “células distintas de FL1-H” o “células no autofluorescentes” se refiere a células que se clasifican mediante clasificación celular activada por fluorescencia a través de un método según la invención, especialmente mediante la detección y clasificación selectivas de células que presentan una morfología específica (baja/media FSC y media/alta SSC), no son fluorescentes en el canal FL1 y presentan un ligero cambio positivo en la fluorescencia detectada en el canal FL3 o FL4.

45 El término “alta FSC” o “alta FSC-H” o “alta FSC-A” significa dispersión frontal y corresponde a la medición del tamaño y la velocidad de la partícula (¿célula?) (diámetro celular entre 5-7 μm).

El término “baja/media FSC” o “baja/media FSC-H” o “baja/media FSC-A” significa dispersión lateral frontal y corresponde al tamaño de la célula (diámetro celular < 5-7 μm).

50 El término “media/alta SSC” o “media/alta SSC-H” o “media/alta SSC-A” significa dispersión lateral u ortogonal y corresponde a la complejidad o granularidad de la célula (células con citoplasma grande y granulares).

55 El término “baja/media SSC” o “baja/media SSCH” o “baja/media SSC-A” significa dispersión lateral u ortogonal y corresponde a la complejidad o granularidad de la célula (células con citoplasma agranular y confinado alrededor del núcleo).

Normalmente, las células FL1⁺ o FL1-H combinaban una “alta FSC” o “alta FSC-H” o “alta FSC-A” con “baja/media SSC” o “baja/media SSC-H” o “baja/media SSC-A”, y por tanto tienen una razón de diámetro nuclear/citoplasmático >1.

60 Normalmente, las células FL1⁰ o distintas de FL1-H combinaban una “baja/media FSC” o “baja/media FSC-H” o “baja/media FSC-A” con “media/alta SSC” o “media/alta SSC-H” o “media/alta SSC-A”, y por tanto tienen una razón núcleo/citoplasma <1.

65 El término “muestra de células madre cancerosas” significa una composición celular aislada según la invención o una composición celular que puede obtenerse mediante un método para la preparación de una composición celular según la invención.

El término “medio de cultivo de células madre” es un medio adecuado para el cultivo de células madre. Normalmente, un medio de cultivo de células madre incluye por ejemplo mitógenos (bFGF, EGF) y medios libres de aporte complementario (B27 o BIT9500).

El término “esferogenicidad” comprende la capacidad de una única célula madre para dividirse simétrica o asimétricamente para formar un clon. Este clon se denomina esfera, y más precisamente, se denomina gliomaesfera cuando la esfera se deriva de un tumor de glioma. Esta capacidad puede medirse mediante ensayo clonal también denominado ensayo de autorrenovación, tal como se describe en el ejemplo 3 y en la figura 2. El ensayo de autorrenovación mide la capacidad de una única célula para formar un clon, pero no todos los clones forman esferas. Sólo las células madre o progenitores iniciales en el desarrollo normal o en determinados tipos de cáncer muestran este potencial esferogénico, y esta especificidad existe en células madre neuronales y de glioma.

El término “multipotencia” comprende la capacidad de las células para diferenciarse en varios tipos celulares, por ejemplo, para las células del sistema nervioso central, multipotencia se refiere a la capacidad para diferenciarse en células tales como GFAP (astrocitos), NESTIN (progenitores neuronales), TUJ1 (neuronas).

El término “recuperación” comprende la transferencia de células FL1⁺ y FL1⁰ de vuelta a los medios de células madre tras el tratamiento. El término “agente antitumoral” comprende moléculas susceptibles de tener una actividad terapéutica en un cáncer, por ejemplo eficaces en el tratamiento de un cáncer tal como en la disminución o supresión del crecimiento tumoral, en la prevención, disminución o supresión de la recidiva del cáncer. Comprende agentes que se conocen por su actividad terapéutica en un cáncer o agentes que se investigan para determinar su capacidad para tener una actividad terapéutica en un cáncer. El término “recidiva” significa la capacidad de una célula madre cancerosa para sobrevivir, para mantener sus propiedades intrínsecas (por ejemplo autofluorescencia en el canal FL1, esferogenicidad), su capacidad de división y opcionalmente para mantener propiedades adicionales (por ejemplo capacidad de diferenciación medida mediante la expresión de marcadores de diferenciación, propiedades de capacidad de células madre medidas mediante la expresión de marcadores de capacidad de células madre y propiedades metabólicas tales como las medidas mediante la actividad y la razón de enzimas NAD/NADPH⁺ usando un ensayo colorimétrico de óxido-reducción (MTS)) tras el tratamiento mediante un agente. La medición de recidiva se realiza mediante un ensayo de selección y comprende los análisis de la presencia y la proporción de células FL1⁺ y FL1⁰ tras el tratamiento tal como se resume en la figura 14. El nivel de recidiva se evaluará partiendo de la base de la proporción de células madre cancerosas supervivientes tras el tratamiento durante el periodo de recuperación y de la duración del periodo de recuperación durante el cual no se observa recidiva de células madre cancerosas.

El término “capacidad para inhibir recidiva de células madre cancerosas” se refiere a la propiedad de un agente que puede disminuir el número de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas tras el tratamiento y tras la observación de un periodo de recuperación tras este tratamiento. Preferiblemente, la capacidad para inhibir la recidiva de células madre cancerosas es la capacidad de un agente para eliminar células madre cancerosas de una muestra de células madre cancerosas y para evitar la recidiva de esas células tras la observación de un periodo de recuperación.

El término “agente” incluye cualquier molécula (por ejemplo química, biológica) o cualquier factor externo/medioambiental (por ejemplo, mecánico, radiación).

El término “muestra de células madre cancerosas” significa una muestra seleccionada de un cultivo de gliomaesferas (cultivadas tal como se describe en los ejemplos) que contiene una mezcla de células FL1⁺ y FL1⁰ según la invención o una muestra que contiene dos poblaciones de células FL1⁺ o FL1⁰ aisladas en las que las células se aíslan mediante un método según la invención.

Tal como se usa en el presente documento, “tratamiento” y “tratar” y similares significan generalmente obtener un efecto farmacológico y fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a la prevención o prevención parcial de una enfermedad, síntoma o estado de la misma y/o puede ser terapéutico en cuanto a una cura parcial o completa de una enfermedad, estado, síntoma o acontecimiento adverso atribuido a la enfermedad. El término “tratamiento” tal como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o aliviar la enfermedad, es decir, producir la regresión de la enfermedad y/o sus síntomas o estados.

El término “inhibidor” usado en el contexto de la invención se define como una molécula que completa o parcialmente la actividad de la molécula biológica.

El término “aislada” se usa para indicar que la célula está libre de asociación con otras células, proteínas o polipéptidos, por ejemplo como un producto de una purificación o como un extracto purificado.

El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento se refiere a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos incluyen seres humanos, primates, animales domesticados tales como reses, ovejas, cerdos, caballos y similares.

5 En una realización, se proporciona un método para la preparación de una composición celular, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una muestra de células tumorales;

10 (b) cultivar opcionalmente las células proporcionadas en (a) en un medio de cultivo;

(c) aislar en una submuestra las células que presentan emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a una longitud de onda de o de aproximadamente 488 nm mediante clasificación celular activada por fluorescencia, a partir de las células proporcionadas en la etapa (a) o (b);

15 (d) aislar en otra submuestra mediante clasificación celular activada por fluorescencia las células que no fluorescen en la etapa (c) y que presentan un ligero cambio positivo en la fluorescencia detectada en el canal FL3 y/o FL4;

(e) excluir las células muertas de cada una de las submuestras de células aisladas obtenidas en las etapas (c) y (d);

20 (f) Reunir la submuestra de células obtenida en la etapa (c) tras el tratamiento en la etapa (e);

(g) reunir la submuestra de células obtenida en la etapa (d) tras el tratamiento en la etapa (e).

25 En una realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que las células aisladas en la etapa (c) son aquellas que presentan adicionalmente una morfología específica (alta FSC y baja/media SSC) en la clasificación celular activada por fluorescencia.

30 En una realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que las células aisladas en la etapa (d) son aquellas que presentan adicionalmente una morfología específica (baja/media FSC y media/alta SSC) en la clasificación celular activada por fluorescencia.

En una realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que la emisión de autofluorescencia detectada en la etapa (c) se detecta en el canal FL1, a una longitud de onda de o de aproximadamente 520 nm.

35 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que la emisión de autofluorescencia detectada en la etapa (c) se detecta en el canal FL1 con un espejo dicróico a 530 nm +/-15 nm.

En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que la emisión de autofluorescencia detectada en la etapa (c) se detecta en el canal FL1 con un espejo dicróico a 515 nm +/-5 nm.

40 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que el ligero cambio positivo en la emisión de fluorescencia detectada en la etapa (d) se detecta a una longitud de onda > 630 nm.

45 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que se excluyen células muertas en la etapa (e) mediante adición de azul de tripano a las submuestras obtenidas en las etapas (c) y (d).

En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que la muestra de células tumorales proporcionada en la etapa (a) es una muestra en la que las células se han cultivado tras la disociación de una muestra de tumor.

50 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que la muestra de células tumorales proporcionada en la etapa (a) es una muestra recién disociada de una muestra de tumor.

55 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que el medio de cultivo en la etapa (b) se selecciona de un medio de células madre, un medio rico en suero y un medio de cultivo de diferenciación.

En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que la muestra de células tumorales proporcionada en la etapa (a) es una muestra en la que las células se han disociado de una muestra de tumor seleccionada de gliomas, schwannomas, metástasis del cerebro, meningiomas y ependimomas.

60 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método en el que la muestra de células tumorales proporcionada en la etapa (a) es una muestra en la que las células se han disociado de una muestra de tumor seleccionada de una metástasis del cerebro por melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón.

65 En otra realización, la divulgación proporciona una composición celular aislada que comprende células vivas que presentan una emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a o a

aproximadamente 488 nm mediante clasificación celular activada por fluorescencia.

5 En otra realización adicional, la divulgación proporciona una composición celular aislada que comprende células vivas que presentan una morfología específica (alta FSC y baja/media SSC) y una emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a o a aproximadamente 488 nm mediante clasificación celular activada por fluorescencia.

10 En otra realización, la divulgación proporciona una composición celular aislada que comprende células vivas que no presentan una emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a o a aproximadamente 488 nm y presentan un ligero cambio positivo en la fluorescencia detectada en el canal FL3 y/o FL4 mediante clasificación celular activada por fluorescencia. En otra realización adicional, la divulgación proporciona una composición celular aislada que comprende células vivas que no presentan una morfología específica (alta FSC y baja/media SSC), ni una emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a o a aproximadamente 488 nm, pero presentan una morfología específica (baja/media FSC y media/alta SSC), un ligero cambio positivo en la fluorescencia detectada en el canal FL3 y/o FL4 mediante clasificación celular activada por fluorescencia.

20 En otra realización, la divulgación proporciona una composición celular aislada que comprende una submuestra de células que puede obtenerse mediante un método según la divulgación.

En una realización adicional, la divulgación proporciona una composición celular aislada en la que la submuestra de células se obtiene en la etapa (f).

25 En otra realización adicional, la divulgación proporciona una composición celular aislada en la que la submuestra de células se obtiene en la etapa (g).

En otra realización adicional, la divulgación proporciona una composición celular aislada en la que las células son células de glioma.

30 En otra realización, la divulgación proporciona un kit que comprende al menos una composición celular según la divulgación.

En otra realización, la invención proporciona un método de selección para seleccionar agentes antitumorales que comprende las etapas siguientes:

35 (i) combinar una composición celular aislada según la invención (células FL1⁺), en presencia/ausencia de un agente que va a examinarse;

40 (ii) determinar la capacidad del agente para inhibir al menos una función de las células FL1⁺.

En una realización adicional, la invención proporciona un método de selección para seleccionar agentes antitumorales en el que la etapa (ii) comprende determinar la capacidad del agente para inhibir la función de células FL1⁺ midiendo la autorrenovación, la tumorigenicidad y el enriquecimiento para determinar las propiedades génicas de capacidad de células madre, el ciclo celular y las funciones metabólicas.

45 En otra realización, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células, que comprende las etapas siguientes:

50 (a) proporcionar una muestra de células;

(b) cultivar opcionalmente las células proporcionadas en (a) en un medio de cultivo;

55 (c) detectar células mediante clasificación celular activada por fluorescencia que presentan emisión de autofluorescencia en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a una longitud de onda de o de aproximadamente 488 nm a partir de las células proporcionadas en la etapa (a) o (b);

60 (d) detectar células mediante clasificación celular activada por fluorescencia que no presentan emisión de autofluorescencia en el canal FL1 en la etapa (c) y presentan un ligero cambio positivo en la emisión de fluorescencia celular en el canal FL3 y/o FL4 tras excitación por haz de láser de células proporcionada en la etapa (a) o (b);

(e) determinar la razón de señales de fluorescencia obtenidas en la etapa (d) y obtenidas en la etapa (c).

65 En otra realización, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que las células detectadas en la etapa (c) son aquellas que presentan adicionalmente una morfología específica (alta FSC y baja/media SSC) en la clasificación celular activada por

fluorescencia.

5 En otra realización, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que las células detectadas en la etapa (d) presentan adicionalmente una morfología específica (baja/media FSC y media/alta SSC) en la clasificación celular activada por fluorescencia.

10 En otra realización, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que el método comprende adicionalmente una etapa (f) tras la etapa (c) de calcular el porcentaje de células detectadas en la etapa (c) dentro de la muestra.

15 En una realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (f), una etapa (g) de comparar el porcentaje calculado en la etapa (f) con un porcentaje patrón (por ejemplo desde o de aproximadamente el 0,1% hasta a aproximadamente el 6%).

20 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (d), una etapa (h) de aislar en muestras separadas células (FL1⁺ y FL1⁰) detectadas en la etapa (d) y/o en la etapa (c).

25 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (h), una etapa (j) de seleccionar la población de células viables de muestras de células aisladas en la etapa (h).

30 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (j), una etapa (k) de caracterizar al menos una propiedad de las células proporcionada en la etapa (j), en el que las propiedades se seleccionan de propiedades de células madre, tumorigenicidad, integración, autorrenovación y multipotencia.

35 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (j), una etapa (k) de determinar la expresión de al menos un marcador de diferenciación (por ejemplo mediante inmunquímica o mediante tinción por FACS de TUJ1, MAP2 o GFAP) en las muestras de células proporcionadas en la etapa (j).

40 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (j), una etapa (k') de determinar la expresión de al menos un marcador de capacidad de células madre (por ejemplo mediante qRT-PCR usando genes de NANOG, OCT4, SOX2, NOTCH1) en las muestras de células proporcionadas en la etapa (j).

45 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (j), una etapa (k'') de determinar el porcentaje de células en división en las muestras de células proporcionadas en la etapa (j) (por ejemplo mediante análisis del ciclo celular por FACS con yoduro de propidio, inmunquímica o tinción por FACS con un anticuerpo anti-Ki67).

50 En otra realización, la divulgación proporciona un método de detección de la recidiva de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas, que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar una muestra de células madre cancerosas;

55 (b) tratar la muestra de células madre cancerosas proporcionada en (a) con un agente;

(c) incubar la muestra de células madre tratada en un medio de cultivo de células madre durante un periodo de incubación sin tratamiento;

60 (d) seleccionar la población de células viables de la muestra de células madre incubada en la etapa (c);

(e) medir el nivel medio de autofluorescencia en la población de células viables aislada en la etapa (d) detectando, mediante clasificación celular activada por fluorescencia, células que presentan emisión de autofluorescencia en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a una longitud de onda de o de aproximadamente 488 nm;

65 (f) aislar células mediante clasificación celular activada por fluorescencia que tienen una morfología específica (alta

FSC y baja/media SSC) y presentan emisión de autofluorescencia en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a una longitud de onda de o de aproximadamente 488 nm de la población de células viables aislada en la etapa (d);

5 (g) aislar células mediante clasificación celular activada por fluorescencia que tienen una morfología específica (baja/media FSC y media/alta SSC), no presentan emisión de autofluorescencia en el canal FL1 en la etapa (d) y presentan un ligero cambio positivo en la emisión de fluorescencia celular en el canal FL3 y/o FL4 tras excitación por haz de láser de la población de células viables aislada en la etapa (d);

10 (h) calcular el porcentaje de células viables autofluorescentes comparando el nivel medio de autofluorescencia en la muestra de células madre cancerosas proporcionada en la etapa (a) y el nivel medio de autofluorescencia medido en la etapa (e);

15 (i) calcular el porcentaje de la muerte celular comparando el número de células iniciales presentes en la muestra de células madre cancerosas proporcionada en la etapa (a) y la población de células viables resultante aislada en la etapa (d);

20 (j) calcular el porcentaje de células viables FL1⁺ comparando el número de células iniciales FL1⁺ presentes en la muestra de células madre cancerosas proporcionada en la etapa (a) y la población de células FL1⁺ viables resultante aislada en la etapa (f);

(k) calcular el porcentaje de células FL1⁰ viables comparando el número de células FL1⁰ iniciales presentes en la muestra de células madre cancerosas proporcionada en la etapa (a) y la población de células FL1⁰ viables resultante aislada en la etapa (g);

25 (l) detectar la esferogenicidad de las poblaciones de células detectadas en las etapas (f) y (g);

(m) determinar la actividad del agente a través de su capacidad para inhibir recidiva de células madre cancerosas.

30 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la recidiva de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (1), una etapa (11) de determinar la expresión de al menos un marcador de diferenciación (por ejemplo mediante inmunquímica o mediante tinción por FACS de TUJ1, MAP2 o GFAP) en las poblaciones de células detectadas en las etapas (f) y (g).

35 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la recidiva de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (1), una etapa (12) de determinar la expresión de al menos un marcador de capacidad de células madre (por ejemplo mediante qRT-PCR usando genes de NANOG, OCT4, SOX2, NOTCH1) en las poblaciones de células detectadas en las etapas (f) y (g).

40 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la recidiva de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (1), una etapa (13) de determinar el porcentaje de células en división en las poblaciones de células detectadas en las etapas (f) y (g) (por ejemplo mediante análisis del ciclo celular por FACS con yoduro de propidio, inmunquímica o tinción por FACS con un anticuerpo anti-Ki67).

45 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la recidiva de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (1), una etapa (14) de determinar la actividad metabólica de células FL1⁺ y FL1⁰.

50 En otra realización adicional, la divulgación proporciona un método de detección de la recidiva de células madre cancerosas en una muestra de células madre cancerosas en el que el método comprende adicionalmente, tras la etapa (1), una etapa (14) de determinar el contenido en y las actividades de NADH y LDH en las poblaciones de células detectadas en las etapas (f) y (g) (por ejemplo mediante ensayo colorimétrico).

55 En un aspecto particular según la invención, la muestra de células tumorales es una muestra de células tumorales de mamífero.

60 En una realización adicional, la muestra de células tumorales es una muestra de células tumorales humanas.

En una realización adicional, la invención se refiere a un ensayo de selección que comprende o usa una composición celular aislada según la divulgación.

65 PROCEDIMIENTOS Y CONDICIONES GENERALES

El método según la divulgación es un método no tóxico y directo para identificar, purificar y enriquecer células madre

o inmaduras de inicio de cáncer a partir de una muestra de células (por ejemplo células disociadas de tumores como gliomas, tumores derivados del sistema nervioso periférico (schwanomas), metástasis del cerebro, meningiomas yependimomas, que pueden mostrarse a modo de ejemplo esquemáticamente tal como se presenta en la figura 1.

- 5 Para la preparación de una muestra de células tumorales (por ejemplo de origen humano) para su uso en un método según la invención en la etapa (a) y una composición según la invención, las células se preparan según el protocolo general tal como sigue:

10 (A) Biopsia

Se obtiene una biopsia del tejido tumoral correspondiente en condiciones estériles usando métodos convencionales adaptados a las células específicas que se recogerán. Los ejemplos de muestras de tumor usadas se enumeran en la figura 9A.

15 (B) Disociación de células

Entonces se disocian las células del tejido tumoral obtenido a partir de la biopsia (A) usando métodos convencionales tales como métodos enzimáticos (por ejemplo disolución de papaína) y/o mediante métodos mecánicos convencionales (por ejemplo mediante cuchilla y pipeteo vigoroso arriba y abajo) combinados con etapas apropiadas de incubación, lavado, aporte complementario de antibióticos y centrifugación tal como se describe en los métodos convencionales.

Entonces se usan las células recién disociadas obtenidas como muestra de células tumorales o bien (figura 1(a)) de manera extemporánea o bien (figura 1(b)) tras el cultivo y la proliferación celular *ex-vivo* tal como sigue.

25 Cultivo y proliferación celular *ex-vivo*

Las células usadas como muestra de células tumorales en el contexto de la invención pueden cultivarse en diferentes medios tales como en un medio de células madre y similares, en un medio rico en suero y similares o en un medio de cultivo de diferenciación y similares. El medio de cultivo puede adaptarse por el experto en la técnica, dependiendo del tipo de célula tumoral que va a cultivarse. La etapa de cultivo celular comprende una combinación de etapas apropiadas de incubación, lavado, aporte complementario de antibióticos y factores de crecimiento o agentes mitóticos y centrifugación tal como se describe en los métodos convencionales. Estas etapas se repiten hasta que aparece la esfera (gliomaesfera en el caso de que la esfera se derive de un tumor de glioma). Puede someterse a ensayo el aspecto de las esferas mediante ensayo clonal (también denominado ensayo de autorrenovación) tal como se describe en el ejemplo 3 más adelante y en la figura 2. Una vez que las células están comenzando a formar esferas, se disocian las células (por ejemplo mecánicamente) del medio de cultivo celular.

40 Clasificación celular mediante clasificador celular activado por fluorescencia (FACS)

Se clasifican las células mediante clasificación celular activada por fluorescencia detectando y clasificando selectivamente las células que presentan emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser en una submuestra de células. Esta submuestra consiste en una subpoblación de células que presentan tal emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 (también denominadas FL1⁺) que se detecta tras excitación a una longitud de onda de 488 nm (por ejemplo un haz de láser azul, por ejemplo argón) a una longitud de onda de aproximadamente 520 nm. Más específicamente, la autofluorescencia de FL1 puede detectarse en el canal FL1 con un espejo dicróico a 530 nm +/-15, y más estrechamente con un espejo dicróico a 515 nm +/-5, lo que confirma la especificidad del espectro de emisión de autofluorescencia de FL1. Se seleccionan adicionalmente las células que tienen una morfología específica (alta FSC y baja/media SSC).

Se clasifican las células no autofluorescentes (también denominadas FL1⁰) mediante clasificación celular activada por fluorescencia detectando y clasificando selectivamente las células que no fluorescen en el canal FL1 y que presentan un ligero cambio positivo en la fluorescencia detectada en el canal FL3 o FL4 (etapa (e)) en otra submuestra de células. Se seleccionan adicionalmente las células que tienen una morfología específica (baja/media FSC y media/alta SSC).

55 Exclusión de células muertas de la preparación celular

Las células muertas se excluyen de las subpoblaciones de FL1⁺ y FL1⁰ identificadas y aisladas, por ejemplo mediante adición de azul de tripano, contribuyendo de ese modo a amplificar la detección de la subpoblación de FL1⁰ y logrando la discriminación entre las 3 poblaciones de células (células muertas, FL1⁰ y FL1⁺). Las células FL1⁺ aisladas presentan propiedades de capacidad de células madre *in vitro* tales como multipotencia y autorrenovación mediante división simétrica y asimétrica, potencial esferogénico, tumorigenicidad selectiva y pueden propagar el crecimiento tumoral *in vivo* tal como se muestra en los ejemplos más adelante. Además, la población de células autofluorescentes FL1⁺, que expresa preferentemente genes relacionados con la capacidad de células madre, tiene actividad metabólica potenciada.

Usos de las poblaciones de células obtenidas discriminadas

5 Las subpoblaciones aisladas (FL1⁰ y FL1⁺) obtenidas mediante el método según la invención pueden usarse para diferentes fines.

Por ejemplo, puede usarse una composición celular aislada en un método de selección para seleccionar agentes antitumorales (por ejemplo compuestos químicos, fármacos o cualquier compuesto biológico y similares) que comprende las etapas siguientes:

- 10 (i) Combinar una composición celular (células FL1⁺), en presencia/ausencia de un agente que va a seleccionarse;
- 15 (ii) Determinar la capacidad del agente para inhibir al menos una de las propiedades y funciones de las células FL1⁺ (por ejemplo autorrenovación, viabilidad, tumorigenicidad). Por ejemplo, midiendo el porcentaje de células FL1⁺, la actividad metabólica de las células FL1⁺, el ciclo celular y la viabilidad, sometiendo a prueba su capacidad para formar esferas secundarias (figuras 2 y 13).

20 Por ejemplo, puede usarse una composición celular aislada para identificar genes tumorigénicos y dianas génicas anti-tumorales mediante la obtención del perfil (niveles de expresión diferencial de proteínas y ARNm, ARN, proteína) o para identificar péptidos específicos para generar anticuerpos, vacunas, (células dendríticas pulsadas) para estrategia de inmunoterapia.

25 Por ejemplo, puede usarse una composición celular aislada para identificar y desarrollar nuevos aportes complementarios de medio para mejorar las condiciones de cultivo para expandir cultivos celulares a partir de gliomas de bajo grado (grado II, III).

30 Por ejemplo, puede usarse una composición celular aislada para identificar la existencia o la presencia de una FL1⁺ autofluorescente en contexto normal. Esto significa usar la técnica descrita anteriormente para aislar y caracterizar células madre normales con el fin de desarrollar fármacos para reparación tisular, repoblación de células madre, seguimiento, viabilidad de células madre *in vivo*.

35 El método para identificar, purificar y enriquecer células madre o inmaduras de inicio de cáncer a partir de una muestra de células (por ejemplo células disociadas de tumores como gliomas, tumores derivados del sistema nervioso periférico (schwanomas), metástasis del cerebro, meningiomas y ependimomas puede usarse para identificar y definir la razón de células cancerosas inmaduras/madre usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Este método permite analizar las células con un alto nivel de autofluorescencia de FL1⁺ (media >10¹) o un bajo nivel de autofluorescencia de FL1⁰ (media <101).

40 Este método puede usarse para detectar la presencia de células cancerosas madre o inmaduras en una muestra de células por ejemplo para diagnóstico.

45 Normalmente, en un aspecto, se proporciona un método en el que la muestra de células proporcionada en la etapa (a) es una muestra de un paciente que padece un cáncer o que se sospecha que padece un cáncer tal como por ejemplo gliomas, schwanomas, metástasis del cerebro, meningiomas y ependimomas humanos. Además, en otro aspecto, se proporciona un método en el que la muestra de células proporcionada en la etapa (a) es una muestra de un paciente que padece un cáncer metastásico o que se sospecha que padece un cáncer tal como por ejemplo metástasis del cerebro por melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón.

50 Según un aspecto, el método de la invención puede comprender adicionalmente una etapa de comparar el porcentaje calculado de células detectadas mediante autofluorescencia por FACS en el canal FL1 tras excitación por láser con un porcentaje patrón. Normalmente, este porcentaje patrón es un porcentaje de células calculado mediante el mismo método en una muestra de células de un paciente sano o una muestra de células del mismo paciente medido anteriormente (por ejemplo antes de la cirugía, antes del tratamiento, justo tras la cirugía, justo tras el tratamiento, etc.).

55 Una vez que se detectan estas células FL1⁺, puede prescribirse la resección local específica o el tratamiento del tumor *in vivo*.

60 En ausencia de marcadores de células madre específicos y fiables y debido a la complejidad de la clasificación mediante patrones o "firmas" completos, podría resultar más apropiado usar medios indirectos tales como características o propiedades morfológicas que reflejan o que están correlacionadas de manera razonable con un estado de capacidad de células madre aumentado. Por tanto, es útil reconsiderar los criterios para la detección de células de inicio de glioma y usar una estrategia de selección según la invención no basada en marcadores moleculares predeterminados, sino en características celulares generales, robustas y fácilmente detectables tal como se muestra en la figura 13 (autofluorescencia, morfología particular o estado metabólico). La combinación adicional de una primera etapa de clasificación no molecular fácil con diferentes marcadores moleculares podría

perfeccionar en el futuro el aislamiento de células madre de glioma.

A continuación se describirán en el presente documento ejemplos que ilustran la invención de una manera más detallada y haciendo referencia a las realizaciones representadas en las figuras. La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento, que se proponen como ilustraciones únicas de aspectos individuales de la invención, y los métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, resultarán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y de los dibujos adjuntos. Tales modificaciones pretenden incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Las siguientes abreviaturas se refieren respectivamente a las definiciones a continuación: mg (miligramos), ml (mililitros), mM (milimolar), min (minuto), ng (nanogramos), nm (nanómetros), rpm (rotación per minuto), LMA (leucemia mieloide aguda), MC (medio condicionado), EGF (factor de crecimiento epidérmico), DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), FACS (clasificador celular activado por fluorescencia), FBS (suero bovino fetal), FSC (dispersión frontal), FGF-2 (factor 2 de crecimiento de fibroblastos), LDH (lactato deshidrogenasa), MHC I (complejo mayor de histocompatibilidad I), IRM (obtención de imágenes mediante resonancia magnética), MTS ([3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna); NADH (nicotinamida adenina dinucleótido), PBS (solución salina tamponada con fosfato), PES (etosulfato de fenazina), PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), PI (yoduro de propidio), SC (célula madre), SSC (dispersión lateral).

Ejemplo 1: Método para analizar y purificar células de inicio de cáncer recién disociadas (figura 3)

El método según la invención se realiza en una muestra recién disociada de células tumorales (etapa (b) omitida).

1- Se reciben muestras de tumores humanos recientes (gliomas humanos de diferente grados) del quirófano, se colocan en un recipiente que contiene PBS 1x.

2- Se disocia la muestra de tumor usando papaína (3 mg/ml de disolución de activación Worthington) disuelta en disolución de activación (EDTA 1,1 Mm, L-cisteína 5,5 mM/HCl, Sigma) y cortando mecánicamente.

3- La incubación dura 45 minutos.

4- Entonces se lavan los fragmentos tumorales con medios (DMEM-F12 de Ham, Gibco) con aporte complementario de penicilina-estreptomina a 1/1.000 (Gibco).

5- Se centrifuga la mezcla de disociación celular a 1.200 rpm durante 15 min a 4°C.

6- Se añade una mezcla de 1:1 de inhibidor de ovomucoide (0,7 mg/ml, Worthington) y ADNasa 10 mg/ml al sedimento de células con el fin de inhibir proteasas. Se pipetea la preparación suavemente arriba y abajo hasta que la mezcla pasa correctamente al interior de las puntas. Finalmente se añaden los medios a una razón ((1:1):8). Si los fragmentos tumorales no se han digerido completamente, se hace pasar la preparación a través de un raspador celular 70 µM.

7- Entonces se centrifuga la preparación a 1.200 rpm durante 5 min a 4°C. Se desecha el sobrenadante. Se resuspende el sedimento de células en 10 ml de medios (DMEM-F12 de Ham Gibco) con aporte complementario de penicilina-estreptomina a 1/1.000 (Gibco), se centrifuga a 1200 rpm durante 5 min a 4°C. Se repite esta etapa dos veces.

8- Se lleva ½ del sedimento de células a 10 ml de medios (DMEM-F12 de Ham Gibco) con aporte complementario de penicilina-estreptomina a 1/1.000 (Gibco), aporte complementario libre de suero B27 (1/50, Gibco) o aporte complementario libre de suero BIT9500 (al 20%, Stemcell Technologies), EGF recombinante humano (20 ng/ml, Invitrogen) y FGF-2 básico (20 ng/ml, Invitrogen).

9- Se lleva ½ del sedimento de células a 4 ml de PBS 1x para el análisis reciente en el clasificador celular FACSvantage SE.

10- Se calibra el clasificador a una excitación de 488 nm de longitud de onda y se mide la emisión de autofluorescencia de las células en el canal FL1 usando espejos de o bien 515 nm o bien 530 nm con un nivel de detector de hasta 599 nm (aunque 450 nm es suficiente).

11- La adición de azul de tripano (1/1.000 Sigma) en las células tumorales recién disociadas que contienen PBS 1x permite la identificación de células viables en la población autofluorescente (denominada FL1⁺) y la población de

FK1 no autofluorescente (denominada FL1⁰). La medida se realiza en el canal FL3 con un láser de excitación a 488 nm, pero puede realizarse en el canal FL4 con láser de excitación de o bien 546 nm o bien 632 nm.

5 12- El protocolo para analizar células separa las células viables, por tanto las células que presentan baja FSC y baja SSC se excluyen de la separación de R1 FSC-SCC. Esto también incluye glóbulos rojos.

13- Se calcula el porcentaje de células FL1⁺ recién disociadas en la población completa, que incluye glóbulos rojos.

10 14- Puesto que las selecciones de células FL1⁺ y FL1⁰ se realizan específicamente en células tumorales viables (R1* FL1⁺) y (R1* FL1⁰), las separaciones se colocan específicamente en células viables FL1⁺ y FL1⁰ antes de la purificación de las dos subpoblaciones (figura 3).

Ejemplo 2: Método para analizar y purificar células de inicio de cáncer cultivadas en condiciones de células madre (figura 4)

15 El método según la invención se realiza en una muestra de células tumorales cultivadas en condiciones de células madre (en la etapa (b)).

20 1- Se obtienen células a partir del protocolo descrito anteriormente y cultivos derivados del punto 8 descrito anteriormente (8-se lleva ½ del sedimento de células a 10 ml de medios (DMEM-F12 de Ham Gibco) con aporte complementario de penicilina-estreptomicina a 1/1.000 (Gibco), B27 (1/50, Gibco) o BIT9500 (al 20%, Stemcell Technologies), EGF recombinante humano (20 ng/ml, Invitrogen) y FGF-2 básico (20 ng/ml, Invitrogen)).

25 2- Se coloca el cultivo a 37°C en un incubador de CO₂ al 5% durante 48 horas.

30 3- Se centrifuga la suspensión celular a 1.200 rpm durante 5 min a 4°C. Se lava el sedimento de células con PBS 1x, se centrifuga de nuevo y se lleva el sedimento de células a una razón de 1,1 de medio condicionado y medios de células madre (DMEM-F12 de Ham Gibco) con aporte complementario de penicilina-estreptomicina a 1/1.000 (Gibco), B27 (1/50, Gibco) o BIT9500 (al 20%, Stemcell Technologies), EGF recombinante humano (10 ng/ml, Invitrogen) y FGF-2 básico (10 ng/ml, Invitrogen).

35 4- El medio condicionado (MC) resulta del cultivo previo de células de inicio de cáncer tras la centrifugación de células cuando se realizan pases de las células (una vez a la semana). Este MC se almacena a -20°C, se filtra a través de un filtro de jeringa PES de 0,22 mm antes de añadirse a un nuevo cultivo.

5- Se repite el mismo procedimiento de lavado, centrifugación y sustitución de medios durante todos los pases hasta que aparecen las esferas.

40 6- Una vez que las células están comenzando a formar esferas (denominadas gliomaesferas) tal como se observa mediante microscopía, se disocian mecánicamente las células mediante nuevo lavado mecánico un número máximo de 5 veces con medios nuevos, y haciendo pasar las célula a una dilución de 50.000 c/ml.

45 7- Para analizar el porcentaje de células viables FL1⁺ y FL1⁰, se disocian las células (véase 6-), se centrifugan a 1.200 rpm durante 5 min a 4°C, se lavan en PBS 1x y se llevan a 4 ml de PBS 1x.

8- Se calibra el clasificador a una excitación de 488 nm de longitud de onda y se mide la emisión de autofluorescencia de las células en el canal FL1 a 515 ó 530 nm con un nivel de detector de hasta 599 nm.

50 9- El protocolo para analizar células separa las células viables. La adición de azul de tripano (1/1.000, Sigma) en las células tumorales disociadas que contienen PBS 1x permite la identificación de células viables en la población autofluorescente (denominada "FL1⁺") y la población de FL1 no autofluorescente (denominada "FL1⁰"). La medida se realiza en el canal FL3 con un láser de excitación a 488 nm, pero puede realizarse en el canal FL4 con láser de excitación de o bien 546 nm o bien 632 nm.

55 10- Se calcula el porcentaje de células FL1⁺ disociadas en la población viable completa (R1).

60 11- Puesto que la selección de células FL1⁺ y FL1⁰ se realiza específicamente en células tumorales viables (R1* FL1⁺) y (R1* FL1⁰), las separaciones se colocan específicamente en células viables FL1⁺ y FL1⁰ antes de la purificación de las dos subpoblaciones (figura 4).

Ejemplo 3: Caracterización adicional de las propiedades de subpoblaciones de células madre e inmaduras de inicio purificadas obtenidas mediante el método según la invención (figura 6)

65 Las subpoblaciones de células (FL1⁰ y FL1⁺) obtenidas mediante el método según la invención se caracterizan *in vitro* según protocolos convencionales. Más adelante y en las figuras 2, 5 y 12 se facilitan ejemplos de la caracterización *in vitro* (tales como propiedades de capacidad de células madre tales como potencial esferogénico y

5 multipotencia). Además, se someten a prueba las propiedades *in vivo* (tal como potencial tumorigénico) de esas subpoblaciones de células según protocolos convencionales. Más adelante y en la figura 6 se facilitan ejemplos de propiedades *in vivo*. En el presente estudio, se ha aislado una subpoblación de células de glioma humano que presentan una morfología distinta y una emisión específica de autofluorescencia en el canal FL1 tras excitación por
 10 laser a 488 nm. Esta fracción celular, denominada FL1⁺, se detecta tanto mediante microscopía fluorescente (figura 11) como mediante clasificación celular activada por fluorescencia, FACS (figura 3, 4). Las células FL1⁺ se detectan como una pequeña subpoblación en células humanas recién disociadas a partir de tejidos de glioma (0,15-21%, N=11) independientemente del grado y el tipo de tumor. Tras el cultivo en condiciones de enriquecimiento de células madre, las células de glioma forman colonias flotantes denominadas gliomaesferas, que muestran fracciones superiores de células FL1⁺ (4-60%, N=7). Cuando se comparan cultivos de diferentes grados de tumor, la fracción de FL1⁺ permanece estable de manera variable durante más de 10 pases (figura 10, figura 9B).

15 Sin embargo, cuando se siembran en placa células de glioma recién aisladas en condiciones distintas de células madre, que contienen suero, no puede detectarse la fracción de FL1⁺, ni puede transferirse posteriormente a condiciones de cultivo de células madre para recuperar una población de FL1⁺ ni iniciar la formación de esferas (figura 7A). En contraposición, el cebado de células de glioma como gliomaesferas en medio de células madre antes de cultivar en medios con suero es suficiente para mantener una fracción de FL1⁺ que puede iniciar esferas secundarias incluso en medios con suero (datos no mostrados). Además, las gliomaesferas cultivadas principalmente en condiciones de células madre pierden irreversiblemente su fracción de FL1⁺ así como su capacidad clonogénica tras la inducción de diferenciación (figura 7B, figura 12). Estos experimentos sugieren que las células FL1⁺ podrían asociarse con propiedades de capacidad de células madre en gliomaesferas.

25 Puesto que la autorrenovación es una señal de capacidad de células madre en tejidos normales y cáncer, se ha sometido a prueba la capacidad de las células FL1⁺ y no FL1 (FL1⁰) para autorrenovarse mediante la formación de nuevas esferas en ensayos clonales para diversas muestras de tumor (figura 9A). Tras la purificación mediante FACS, se sembraron en placa células FL1⁺ y FL1⁰ como células individuales en condiciones de células madre y el recuento de esferas secundarias mostró una potencial esferogénico significativamente superior en células FL1⁺ (figura 2A). Para comparar la capacidad de autorrenovación a largo plazo, se midió la esferogenicidad de clones de FL1⁺ y FL1⁰ individuales a lo largo de pases sucesivos. Mientras que los clones de FL1⁺ mantenían un potencial esferogénico significativo y estable durante hasta cinco pases, los clones de FL1⁰ se perdieron entre los pases 3 y 4 y ningún clon pudo mantener más la formación de nuevas esferas en el pase 5 (figura 2B). La morfología de las esferas de FL1⁺ y FL1⁰ fue significativamente diferente, siendo las esferas de FL1⁺ más grandes, flotando y pareciendo más sanas que los clones de FL1⁰ parcialmente unidos y de tamaño demasiado pequeño (figura 2C). Estos ensayos clonales demuestran de manera convincente que la aptitud a largo plazo para autorrenovarse se limita selectivamente a un compartimento de FL1⁺ en el glioma humano. No obstante, las células FL1⁰ también son inicialmente células tumorales viables ya que se encuentran no sólo en tejido de glioma recién disociado, sino también en gliomaesferas clonales donde cohabitan con células FL1⁺ y pueden clasificarse y someterse a pases (como esferas) varias veces. Puesto que las gliomaesferas no clasificadas pero clonales contienen una población mixta de células FL1⁺ y FL1⁰ y puesto que las células FL1⁺ tienen un potencial esferogénico superior, las células FL1⁰ deben ser lógicamente células hijas derivadas de células FL1⁺ mediante división asimétrica o mediante pérdida de propiedades de FL1⁺. El análisis de fracciones de FL1⁺ en gliomaesferas no clasificadas y en clones de FL1⁺ y FL1⁰ clasificados derivados de las mismas muestra tras 4 pases que las esferas derivadas de FL1⁺ contienen de nuevo una población mixta de FL1⁺ y FL1⁰. En contraposición, los cultivos derivados de FL1⁰ no recuperan células FL1⁺ significativas. Esto proporciona evidencia de que las células FL1⁰ que se derivan de la población de FL1⁺ permanecen viables durante varios pases pero a su vez no podrían volver a adquirir propiedades autofluorescentes una vez que han cambiado desde el estado de FL1⁺ al de FL1⁰ (datos no mostrados). Por tanto, se sospecha que las células FL1⁰ están destinadas a ser progenitores o células de diferenciación, que han perdido sus propiedades de autorrenovación y tumorigénicas.

50 Se han identificado varios perfiles de firma de células madre o progenitoras en glioma o sus supuestas células madre cancerosas (Clément *et al.*, 2007, Curr. Biol., 17, páginas 165). Además, se ha mostrado que varias rutas de desarrollo desempeñan un papel importante en glioma y sus células madre tales como la ruta sonic hedgehog-gli (Clément *et al.*, 2007, citado anteriormente), Notch1 (Fan *et al.*, 2006, Cancer Res., 66, 7445). Con el fin de entender los mecanismos moleculares que subyacen a los fenotipos de capacidad de células madre selectiva de células de glioma FL1⁺, se ha sometido a prueba la expresión de una selección de 11 genes relacionados con capacidad de células madre en células FL1⁺ y FL1⁰ de 4 gliomas diferentes. Mientras que NANOG, OCT-4, SOX-2, NOTCH-1 y NESTIN están significativamente sobreexpresados (> 2x) en células FL1⁺ de al menos 3 de los 4 gliomas diferentes sometidos a prueba, la expresión de PDGFR- α , PTEN, INT β -1, OLIG-2, ABCG-2, BMI-1 no cambió significativamente (figura 5A). Estos cambios no parecen estar relacionados con una diferencia en la proliferación celular, puesto que el PCNA no mostró una variación significativa entre células FL1⁺ y FL1⁰. Entonces se sometieron a prueba la expresión de los genes de capacidad de células madre y su co-regionalización con células FL1⁺ autofluorescentes usando inmunohistoquímica y obtención de imágenes confocal en gliomaesferas. Aunque la distribución de genes de capacidad de células madre individuales sólo fue parcialmente solapante con células FL1⁺, NANOG, OCT-4, SOX-2, NOTCH-1 y NESTIN mostraron co-regionalización y localización preferentes con células FL1⁺ (figura 11). El hecho de que la mayoría de los genes de capacidad de células madre enriquecidos en las poblaciones de FL1⁺ también se detecten en células FL1⁰ y de que algunas células FL1⁺ en gliomaesferas no

expresen proteínas de capacidad de células madre individuales expresadas por lo demás en la mayoría de FL1⁺ es relevante para el uso de cualquiera de estos genes de capacidad de células madre como posibles marcadores de moleculares de células madre. Además, se usó Ki67 como marcador de índice de proliferación, mostrando que todas las células FL1⁺ son Ki67+ aunque todas las Ki67+ no son FL1⁺ (figura 11). Puesto que el antígeno Ki67 es la proteína nuclear relacionada con el ciclo celular prototipo, expresada por células en proliferación en todas las fases del ciclo celular activo (fases G1, S, G2 y M), estos resultados indican que las células FL1⁰ son viables y proliferan. Sin embargo, un análisis más preciso del ciclo celular reveló que la mayoría de las células FL1⁺ están en fase S-G2/M, mientras que la mayoría de las células FL1⁰ están en fase metabólica G1 (figura 5B). Puesto que varios estudios han relacionado la autofluorescencia con la actividad metabólica celular tal como el estado de NAD/NADPH+, o el contenido en flavina mitocondrial de células madre mesenquimatosas (Schuchmann *et al.*, 2001., Brain Res. Brain Res. Protoc., 7, páginas 267; Reyes *et al.*, 2006, Stem Cells, 24, páginas 1213; Kann *et al.*, 2003, Neuroscience, 119, páginas 87), se ha sometido a prueba por tanto la actividad metabólica de las células FL1⁺ y FL1⁰ usando un ensayo colorimétrico de oxido-reducción (CellTiter 96® AQueous, un ensayo de proliferación celular en disolución de Promega que contiene MTS y un reactivo de acoplamiento de electrones (PES)), basado en la actividad y la razón de enzimas NAD/NADPH+. Se encontró una actividad metabólica significativamente superior (color gris oscuro) en células clasificadas FL1⁺ en comparación con células clasificadas FL1⁰ en 4 de 4 gliomas sometidos a prueba (figura 5C). En consecuencia se observa una clara correlación entre la actividad metabólica, el porcentaje de células en fase S/G2-M y los niveles de autofluorescencia, aunque sigue sin estar claro cómo la autofluorescencia refleja el potencial de capacidad de células madre de una subpoblación de células de glioma.

Si sólo las células de glioma FL1⁺ presentan propiedades de capacidad de células madre tales como autorrenovación y multipotencia *in vitro*, las células de inicio de glioma deben encontrarse de manera plausible dentro de la población de FL1⁺. Para someter a prueba esta posibilidad, se implantó intracranalmente en ratones desnudos (N=47) una carga de 10³, 10⁴ y 10⁵ células FL1⁺ o FL1⁰ clasificadas a partir de diversos cultivos de gliomaesfera (figura 6). A las 4 semanas tras la implantación, el 100% de los ratones en los que se inyectaron 10⁵ células FL1⁺ han desarrollado pérdida de peso significativa y síntomas neurológicos que se correlacionaban con tumores intracraneales en IRM y secciones histológicas, siendo todos ellos significativamente mayores que el observado en un ratón al que se implantaron 10⁵ células no clasificadas procedentes de gliomaesferas (figura 6). Aunque la supervivencia libre de síntomas fue mayor, todos los ratones en los que se implantaron 10⁴ FL1⁺ también desarrollaron síntomas hacia las 6 semanas tras la implantación. En contraposición, no se observó ningún tumor en ninguno de los ratones en los que se inyectaron FL1⁰, ni siquiera con una carga de células intracraneales de 10⁵ tras una observación de más de 3 meses. De manera notable, todos los tumores mostraron una autofluorescencia brillante cuando se observaron con un microscopio confocal en contraposición a tejido de ratón adyacente no tumoral normal. Los análisis de inmunohistoquímica mostraron que los tumores inducidos por FL1⁺ expresan GFAP, NESTIN y algunos TUJ1 y tienen un alto índice proliferativo visualizado mediante tinción con Ki67. El origen humano de las células tumorales se confirmó mediante tinción de MHC1 específica (figura 6A), y permitió la doble selección de células MHC1+, FL1-H. La siembra en placa de células disociadas *in vivo* en condiciones de células madre revela la formación de esferas grandes y numerosas derivadas de cerebros en los que se han implantado FL1⁺ en contraposición a cultivos de cerebros en los que se ha implantado FL1⁰, lo que confirma y amplía la incapacidad de FL1⁰ para revertirse en células FL1⁺ *in vivo*, y lo que confirma que pueden realizarse pases de FL1⁺ *in vivo* (figura 6C). Por tanto, estos datos demuestran claramente el potencial tumorigénico exclusivo *in vivo* de las células FL1⁺.

Se sometió a prueba la expresión del marcador único de células madre, CD 133, y se mostró que las células que expresan CD133 se distribuyen dentro de compartimentos de células tanto FL1⁺ como FL1⁰. El marcador CD133 puede ser útil para enriquecer células en autorrenovación en las fracciones de FL1^{+/0}, encontrándose su significativo beneficio en 2/2 gliomas recientes y en 2/5 cultivos de GIC (eficacia: 57%). Por tanto, las células CD133 sólo representan una subpoblación de la reserva de células de inicio de tumores, y confirma que el uso único y exclusivo de CD133 como marcador de células madre es inapropiado y no esencial. En contraposición, los criterios fenotípicos de FL1 según la invención resultan ser un método muy fiable para aislar células en autorrenovación en 8/8 gliomas recientes y en 7/7 cultivos de GIC (eficacia: 100%).

En resumen, las propiedades de las células FL1⁺ y FL1⁰ se resumen en la figura 13 y las investigaciones y caracterizaciones moleculares revelaron que las células FL1⁺:

- son tumorigénicas
- pueden generar células FL1⁰ y son responsables de mantener los cultivos de GIC a lo largo del tiempo
- son multipotentes
- están enriquecidas en genes relacionados con la capacidad de células madre a nivel del ARN, pero la distribución de las proteínas relacionadas con la capacidad de células madre está distribuida por igual dentro de células hijas de FL1⁺ y FL1⁰
- contienen más del > 40% de células en división activa (en fase G2/M)

- albergan una enorme actividad metabólica (contenido en LDH, NADH, normalmente al menos dos veces los niveles de NADH para FL1⁺ en comparación con FL1⁰ y al menos tres veces los niveles de LDH para FL1⁺ en comparación con FL1⁰).

5 Conjuntamente, estos hallazgos *in vitro* e *in vivo* sugieren que las células de glioma en autorrenovación y de inicio de tumor tienen un fenotipo autofluorescente distinto que puede aprovecharse eficazmente para identificarlas y aislarlas. Además, estos datos sugieren que este fenotipo refleja un estado metabólico superior y está asociado con la expresión preferente de un gen de capacidad de células madre y un perfil de proteínas en las células de inicio de glioma.

10 El método según la invención basado en la autofluorescencia específica permite la selección rápida, precisa y robusta de células de inicio de glioma que puede facilitar considerablemente su caracterización en comparación con el uso de un único marcador molecular.

15 Se ha sugerido que una célula madre o población progenitora inicial rara vez se define sólo por un marcador, sino más bien por una combinación de marcadores moleculares. Por tanto, un único marcador probablemente no restringiría específicamente un compartimento de células madre en gliomas. Resulta interesante que ninguno de los genes de capacidad de células madre que podrían usarse potencialmente como marcadores funcionales de células madre cancerosas se restringió exclusivamente a la población de FL1⁺ y por tanto apenas pudo usarse como marcador único de células madre (figura 6).

Por tanto, podría ser más apropiado considerar el potencial de capacidad de células madre en una subpoblación dada o en células individuales como probabilidad, más que un estado activado/desactivado.

25 Ejemplo 4: Ensayo de examen de recidiva *in vitro* en subpoblaciones celulares de células cancerosas obtenidas mediante el método según la invención (figuras 13 y 14)

Se lleva a cabo un método con el fin de detectar recidiva *in vitro* de células madre cancerosas tal como se describe en la figura 14.

30 Se proporcionan células madre cancerosas preparadas según el método de la invención (células FL1⁺, FL1⁺ y FL1⁰ no clasificadas, FL1⁰) (etapa (a)), se someten a un tratamiento frente al cáncer cada 2,5 días (10 células/μl) en presencia de concentración de factor de crecimiento reducida (EGF y bFGF) (por ejemplo 1 ng/ml) (etapa (b)). Este tratamiento frente al cáncer se selecciona por ejemplo de los tratamientos frente al cáncer usados comúnmente tales como radioterapia (por ejemplo irradiación gamma) y quimioterapia (por ejemplo adición de candidatos de fármaco frente al cáncer). Se incuban las células tratadas en un medio de cultivo de células madre durante un periodo de incubación sin tratamiento (etapa (c)). Se inicia la recuperación cuando se detiene el tratamiento y una vez que las células se transfieren de nuevo a medio de cultivo de células madre. Durante el periodo de incubación (por ejemplo en el día 5, 10 y en el día 20 tras el último día de tratamiento), se miden los parámetros siguientes:

- 40 - porcentaje de muerte celular medida tal como se describe en los ejemplos 1-3 (etapa (h));
- nivel medio de autofluorescencia medida tal como se describe en los ejemplos 1-3 (etapa (i));
- 45 - porcentaje de células FL1⁰ y FL1⁺ viables seleccionadas según criterios de fluorescencia y morfológicos tal como se describe en los ejemplos 1-3 (etapas (f), (g), (j) y (k));
- detección de la esferogenicidad de las células FL1⁰ y FL1⁺ medida tal como se describe en los ejemplos 1-3 (etapa 1);
- 50 - expresión de marcadores de diferenciación (por ejemplo: TUJ1, MAP2, GFAP) medida tal como se describe en los ejemplos 1-3 (etapa 11);
- expresión de los genes de capacidad de células madre (por ejemplo: NANOG, OCT4, SOX2, NOTCH1) medida tal como se describe en los ejemplos 1-3 (etapa 12);
- 55 - porcentaje de células FL1⁰ y FL1⁺ en división (por ejemplo: análisis del ciclo celular con yoduro de propidio, tinción con anticuerpo anti-Ki67) medido tal como se describe en el ejemplo 3 (etapa 13);
- 60 - determinación de la actividad metabólica de las células FL1⁺ y FL1⁰ a través de la medición del contenido en y las actividades de NADH y LDH medidas tal como se describe en los ejemplos 1-3 (etapa 14).

Se evalúa el nivel de recidiva basándose en los parámetros medidos. Por tanto, la capacidad de los tratamientos frente al cáncer para eliminar células FL1⁺ de la muestra de células madre cancerosas es inversamente proporcional al nivel de recidiva medido.

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación de composiciones celulares, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) proporcionar una muestra de células tumorales, obtenida de un paciente,
 - (b) cultivar opcionalmente las células proporcionadas en (a) en un medio de cultivo;
 - 10 (c) aislar en una submuestra las células FL1⁺ que presentan una morfología de alta FSC y baja/media SSC en la clasificación celular activada por fluorescencia y que presentan emisión de autofluorescencia detectada en el canal FL1 tras excitación por haz de láser a una longitud de onda de o de aproximadamente 488 nm mediante clasificación celular activada por fluorescencia, a partir de las células proporcionadas en la etapa (a) o (b);
 - 15 (d) aislar en otra submuestra mediante clasificación celular activada por fluorescencia las células FL⁰ que presentan una morfología de baja/media FSC y media/alta SSC en la clasificación celular activada por fluorescencia, que no fluorescen en la etapa (c) y que presentan un ligero cambio positivo en la fluorescencia detectada en el canal FL3 y/o FL4;
 - 20 (e) excluir las células muertas de cada una de las submuestras de células aisladas obtenidas en las etapas (c) y (d);
 - (f) reunir la submuestra de células obtenida en la etapa (c) tras el tratamiento en la etapa (e);
 - 25 (g) reunir la submuestra de células obtenida en la etapa (d) tras el tratamiento en la etapa (e).
2. Método según la reivindicación 1, en el que la emisión de autofluorescencia detectada en la etapa (c) se detecta en el canal FL1, a una longitud de onda de o de aproximadamente 520 nm.
- 30 3. Método según la reivindicación 1, en el que la emisión de autofluorescencia detectada en la etapa (c) se detecta en el canal FL1 con un espejo dicróico a 530 nm +/-15 nm.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la emisión de autofluorescencia detectada en la etapa (c) se detecta en el canal FL1 con un espejo dicróico a 515 nm +/-5 nm.
- 35 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ligero cambio positivo en la emisión de fluorescencia detectada en la etapa (d) se detecta a una longitud de onda > 630 nm.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se excluyen células muertas en la etapa (e) mediante adición de azul de tripano a las submuestras obtenidas en las etapas (c) y (d).
- 40 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra de células tumorales proporcionada en la etapa (a) es una muestra en la que las células se han cultivado tras la disociación de una muestra de tumor.
- 45 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra de células tumorales proporcionada en la etapa (a) es una muestra recién disociada de una muestra de tumor.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el medio de cultivo en la etapa (b) se selecciona de un medio de células madre, un medio rico en suero y un medio de cultivo de diferenciación.
- 50 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra de células tumorales proporcionada en la etapa (a) es una muestra en la que las células se han disociado de una muestra de tumor seleccionada de gliomas, schwannomas, metástasis del pulmón, metástasis del cerebro, meningiomas y ependimomas.
- 55 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra de células tumorales proporcionada en la etapa (a) se obtuvo de un paciente que padece un cáncer o que se sospechaba que padece un cáncer seleccionado de gliomas, schwannomas, metástasis del cerebro, meningiomas y ependimomas humanos o de un paciente que padece un cáncer metastásico o que se sospecha que padece un cáncer seleccionado de metástasis del cerebro por melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón.
- 60 12. Método de selección para seleccionar agentes antitumorales que comprende las etapas siguientes:
 - 65 (i) combinar las células FL1⁺ obtenidas según el método según las reivindicaciones 1 a 11 en

presencia/ausencia de un agente que va a seleccionarse;

5 (ii) determinar la capacidad del agente para inhibir al menos una función de las células FL1⁺ seleccionada de autorrenovación, tumorigenicidad, viabilidad, enriquecimiento en propiedades génicas de capacidad de células madre, ciclo celular y funciones metabólicas.

10 13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho agente antitumoral comprende moléculas susceptibles de tener una actividad terapéutica en un cáncer seleccionada de disminuir o suprimir el crecimiento tumoral, prevenir, disminuir o suprimir la recidiva del cáncer.

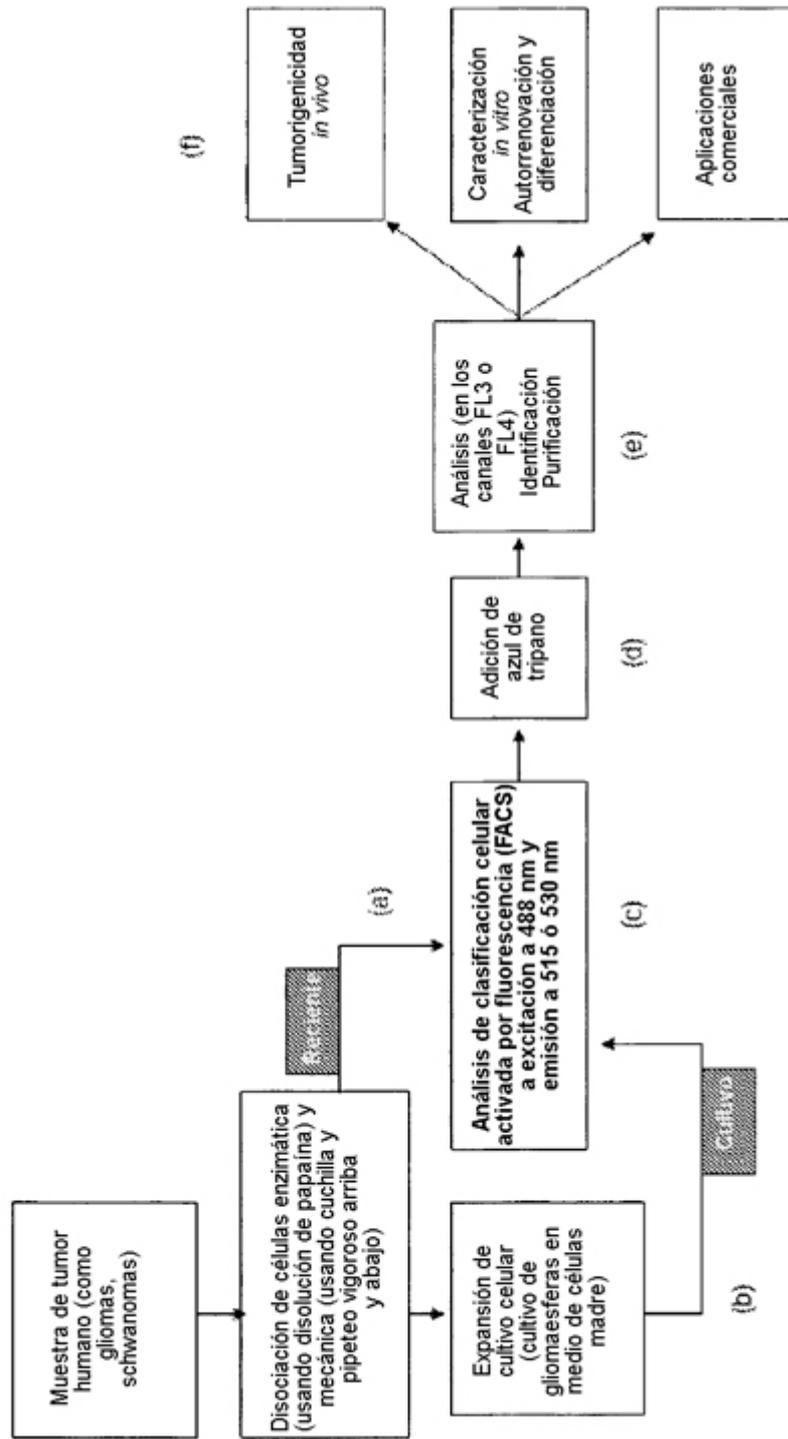


Figura 1

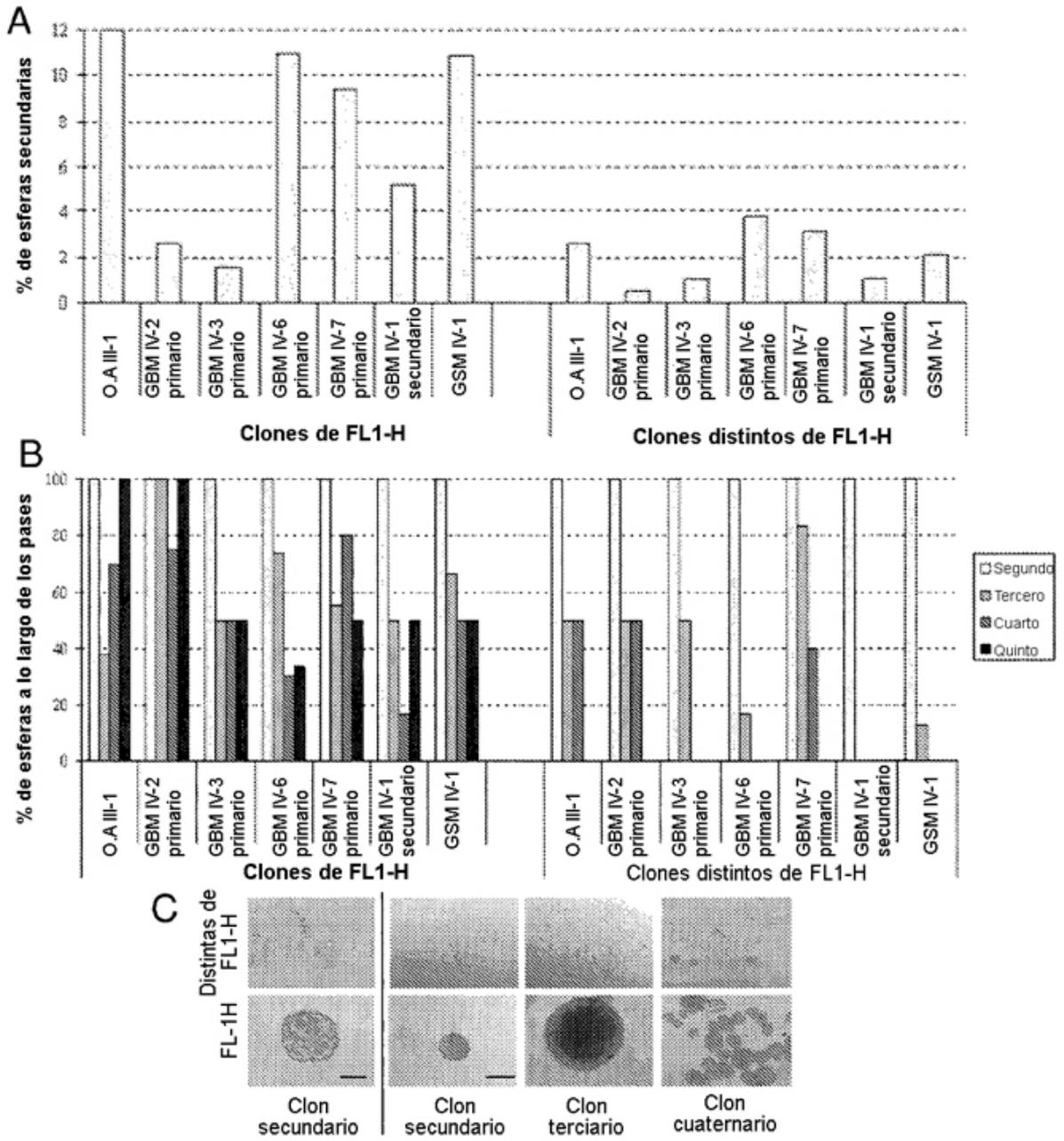


Figura 2

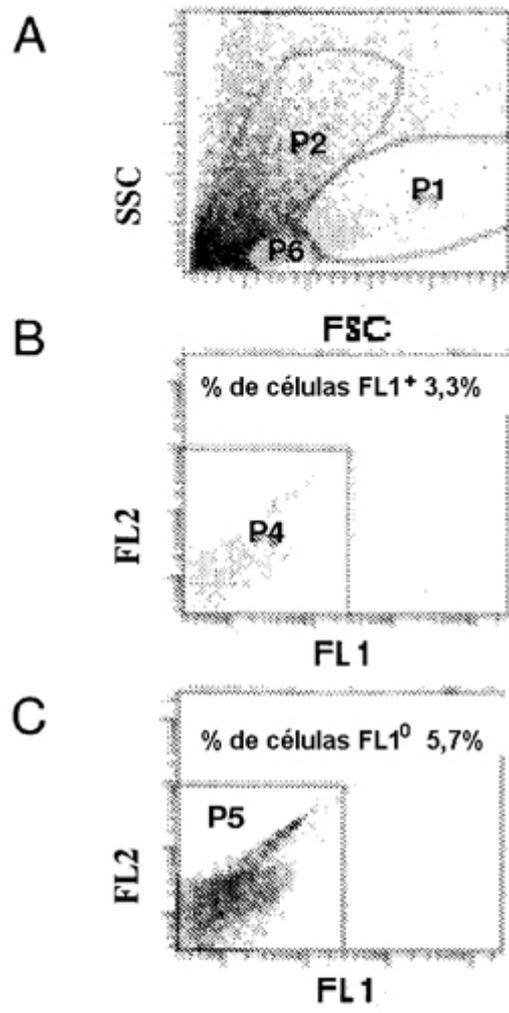


Figura 3

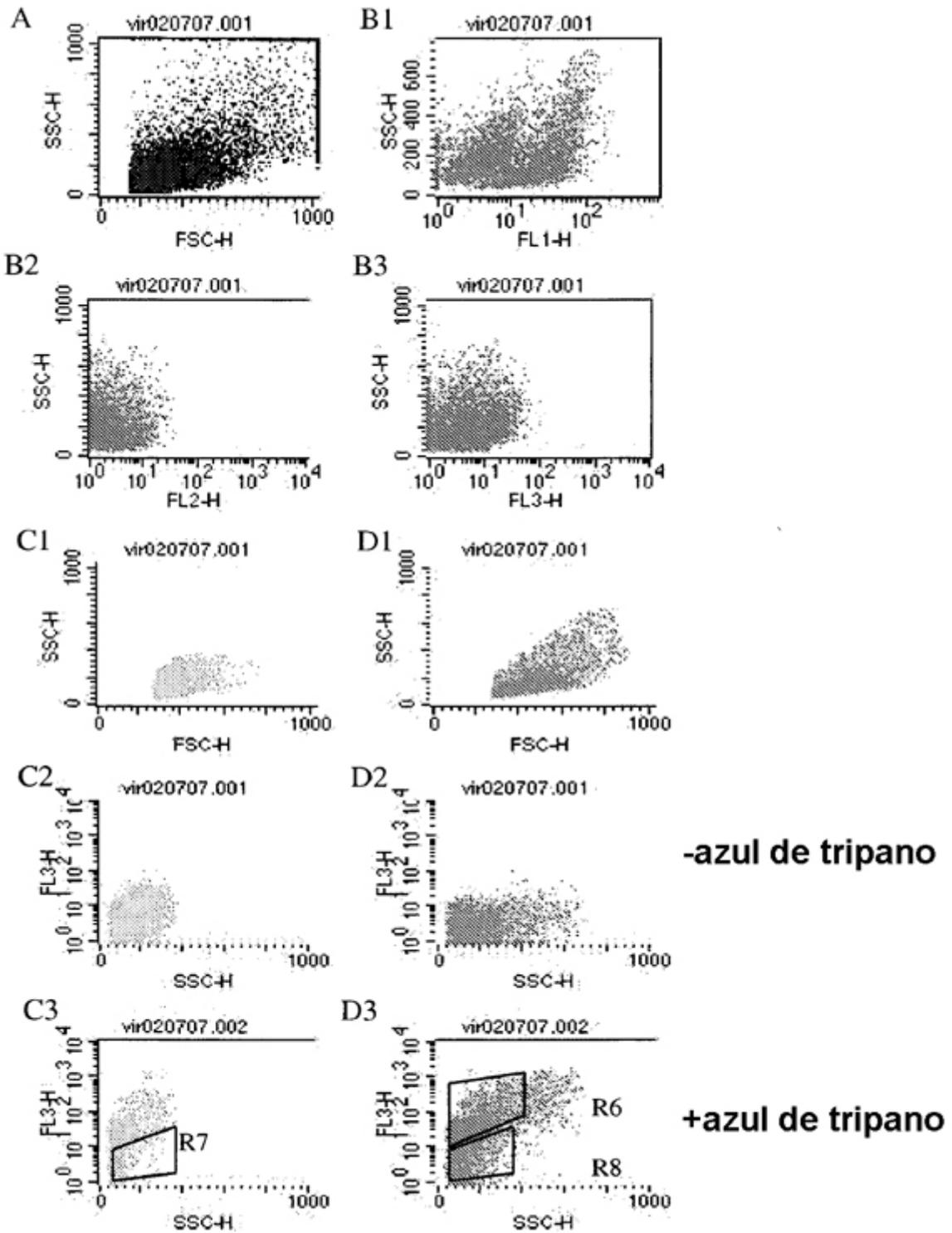


Figura 4

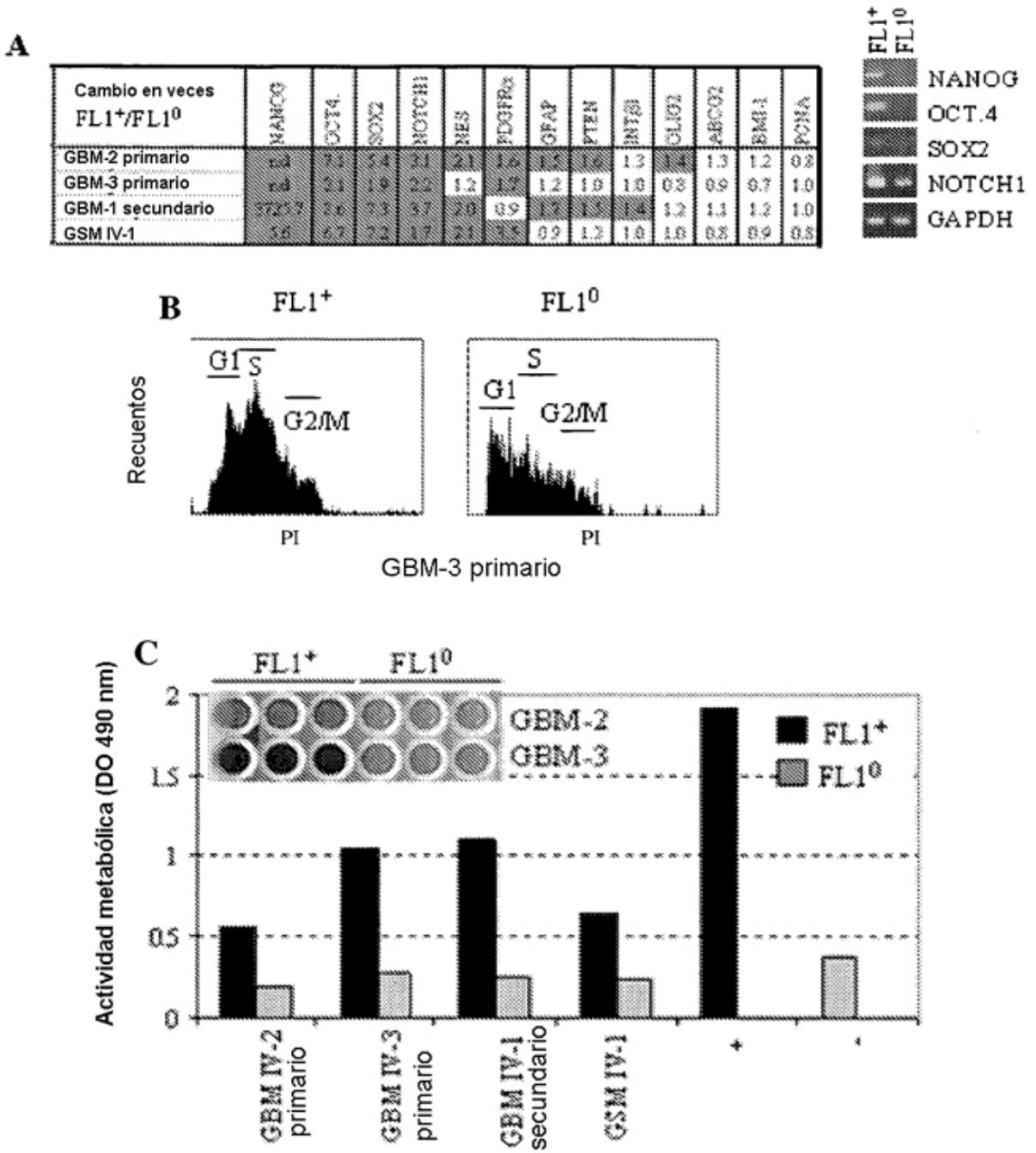


Figura 5

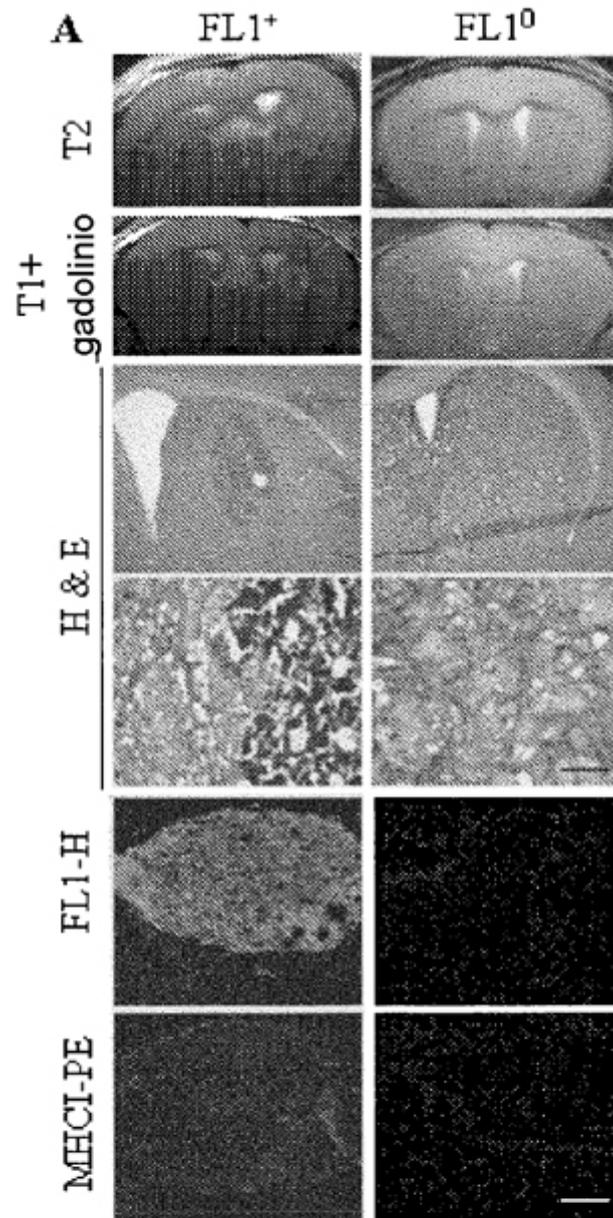


Figura 6

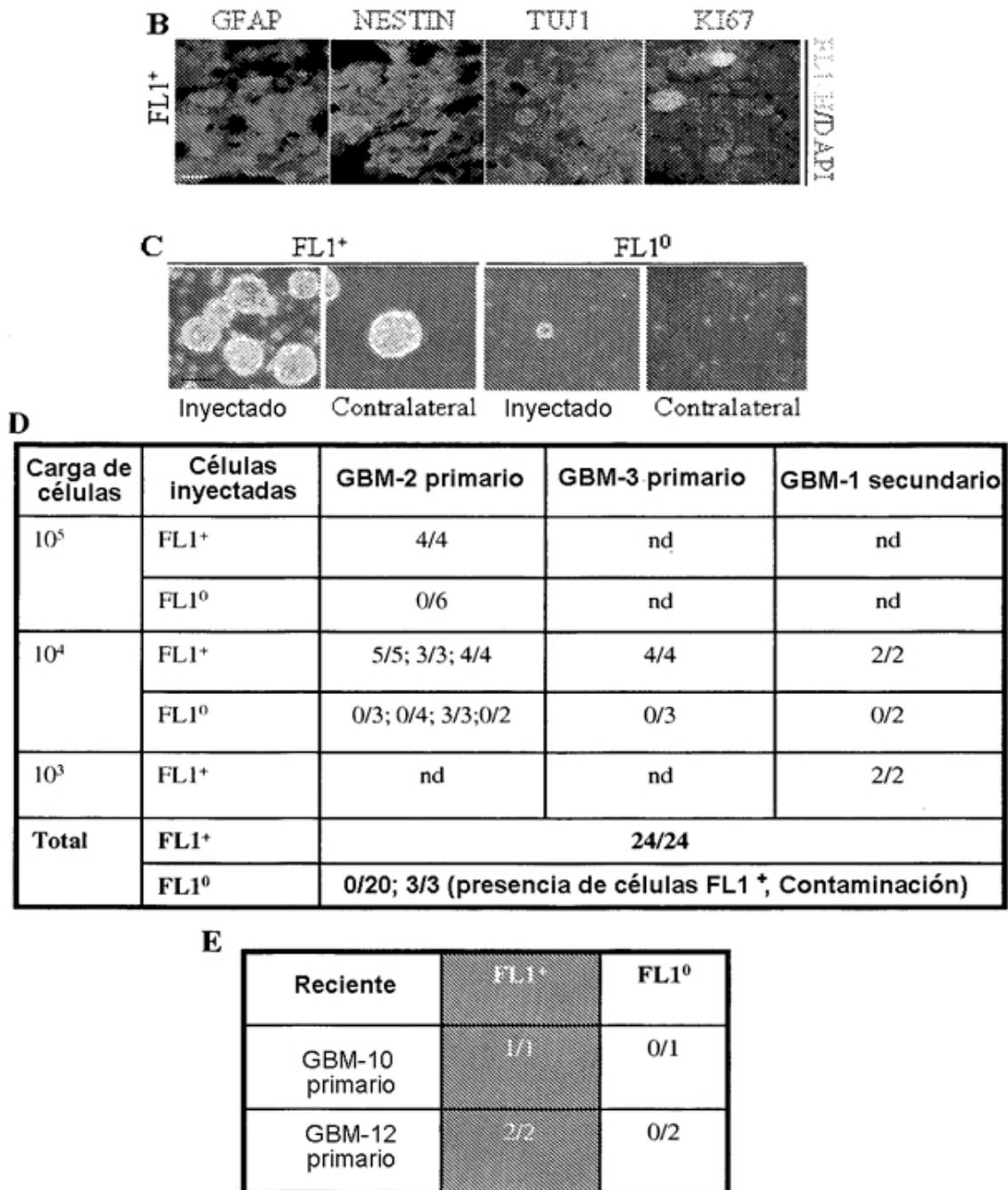


Figura 6

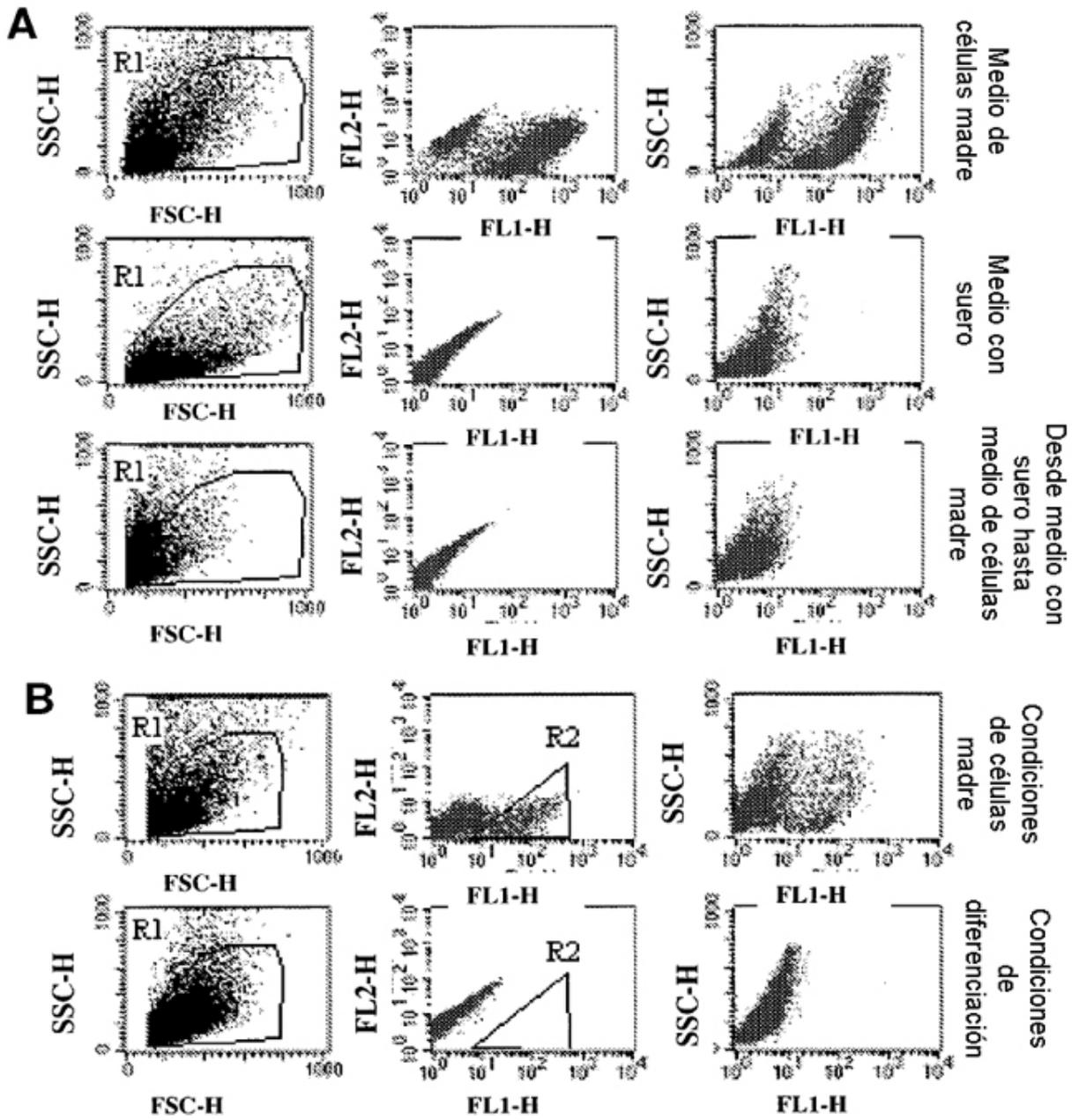


Figura 7

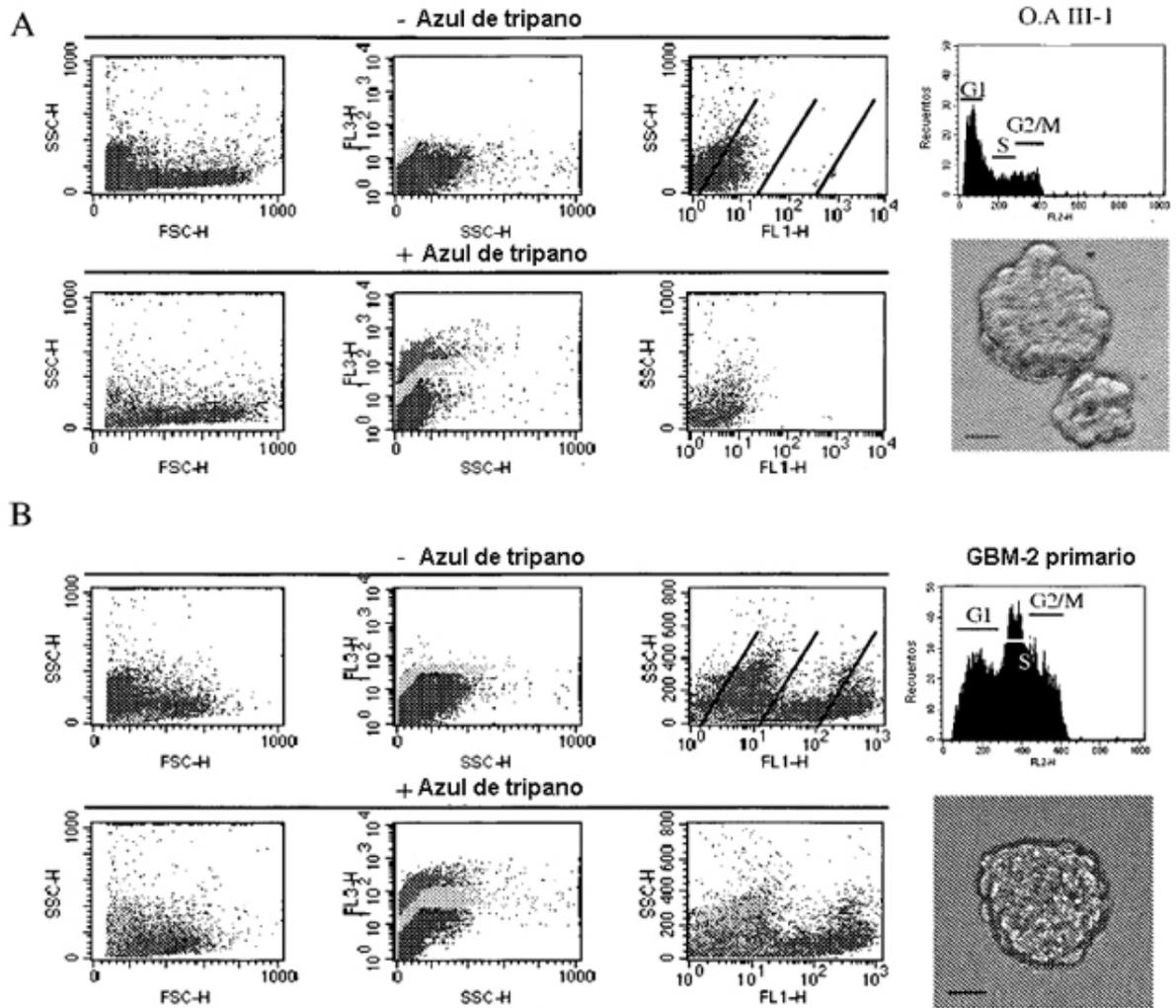


Figura 8

A

Tipo de tumor	Grado	Ubicación	Sexo	Edad
A II-1	Astrocitoma, grado II	Frontal paramedial izquierda	F	22
A II-2	#	nd	M	nd
O.G II-1	Oligodendroglioma, grado II	Frontal derecha (SMA)	F	71
O.A II-1	Oligodendroastrocitoma, grado II	Fronto-basal derecha	F	44
O.A II-2	#	nd	M	41
O.A II-3	#	Perisilviana caudal	F	29
O.A II-4	#	Insular izquierda	M	35
O.A II-5	#	Frontal derecha	F	44
O.G III-1	Oligodendroglioma, grado III	Multifocal insular derecha	M	57
O.G III-2	#	Frontal derecha	M	64
O.G III-3	#		F	37
O.A III-1	Oligodendroastrocitoma, grado III	Temporo-amigdalina izquierda	M	52
O.A III-2	#	Parietal izquierda	F	45
GBM-1 primario	Glioblastoma multiforme, grado IV	Parietal izquierda	M	nd
GBM-2 primario	#	Temporal izquierda	F	67
GBM-3 primario	#	nd	nd	nd
GBM-4 primario	#	Occipital derecha	M	75
GBM-5 primario	#	Perisilviana izquierda	M	52
GBM-6 primario	#	Frontal izquierda	F	64
GBM-7 primario	#	Parietal derecha	F	51
GBM-8 primario	#	Frontal izquierda	F	48
GBM-9 primario	#	Frontal derecha	M	64
GBM-10 primario	#	Multifocal	M	51
GBM-1 secundario	#	Frontal	M	64
GSM IV-1	Gliosarcoma, grado IV	Temporal derecha	M	70

Figura 9

B

Esfera	% de células FL1 ⁺	Media de expresión de FL1-H
O.A III-1	4,1	17,9
GBM-2 primario	32	341,7
GBM-3 primario	44,8	476,7
GBM-6 primario	59,4	381,7
GBM-7 primario	5,5	69,4
GBM-1 secundario	35,8	610,0
GSM IV-1	26,3	43,9

Figura 9

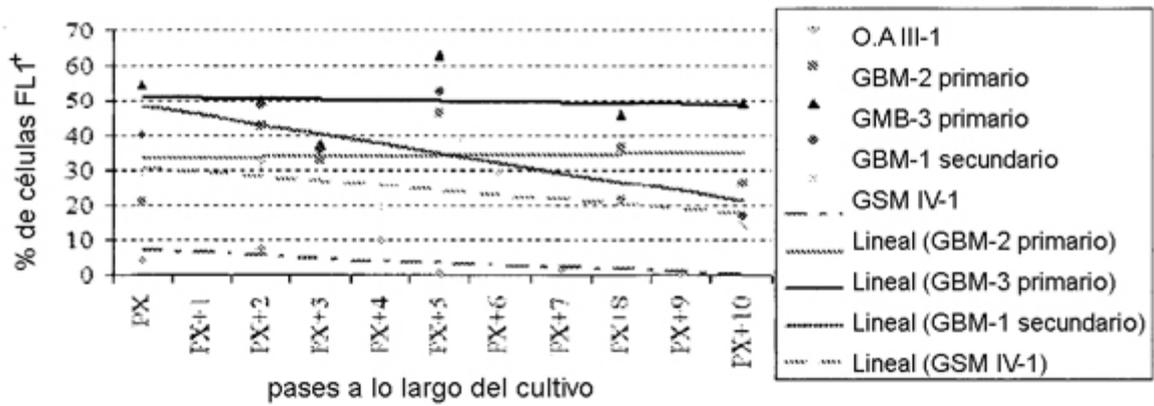


Figura 10

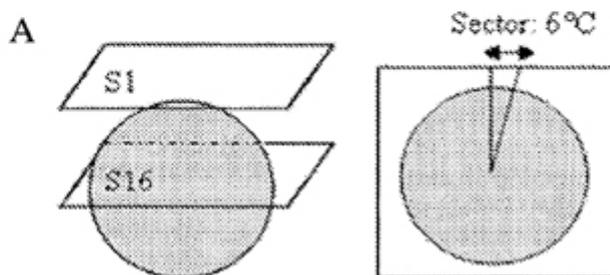
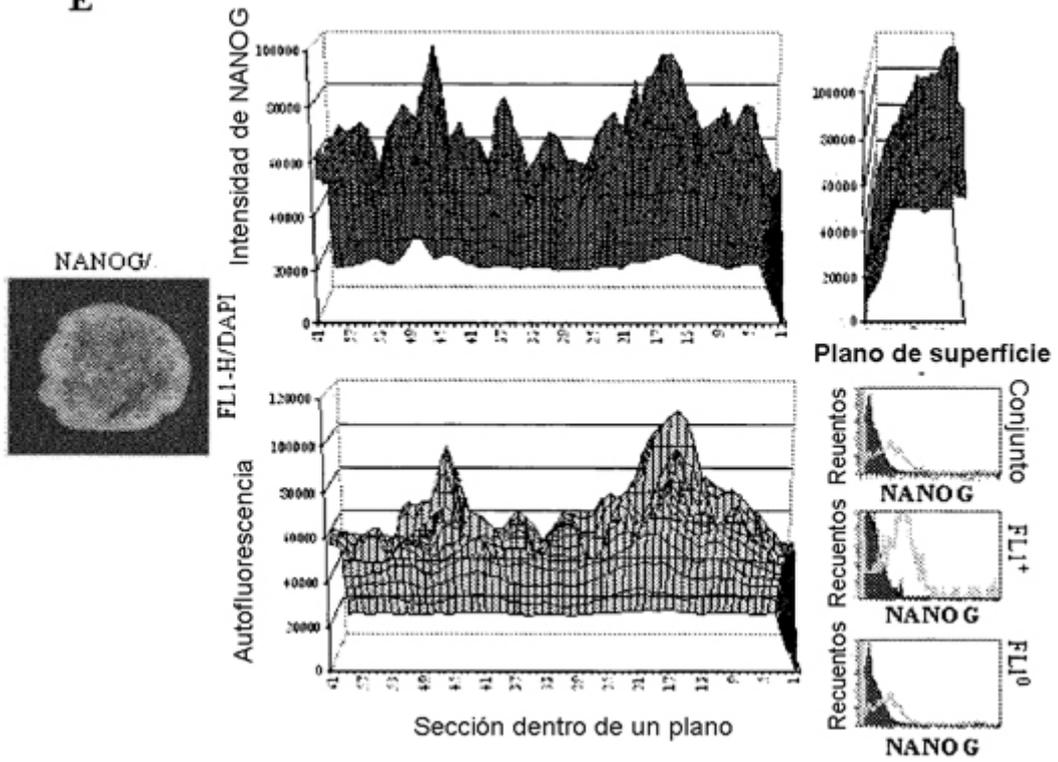


Figura 11

E



F

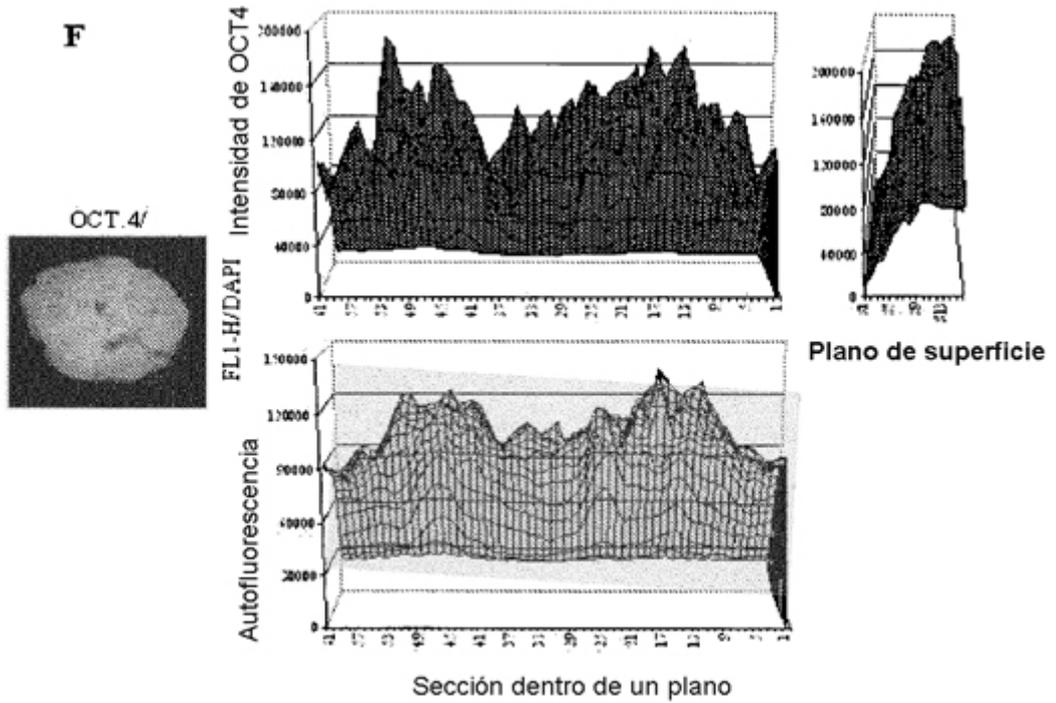


Figura 11

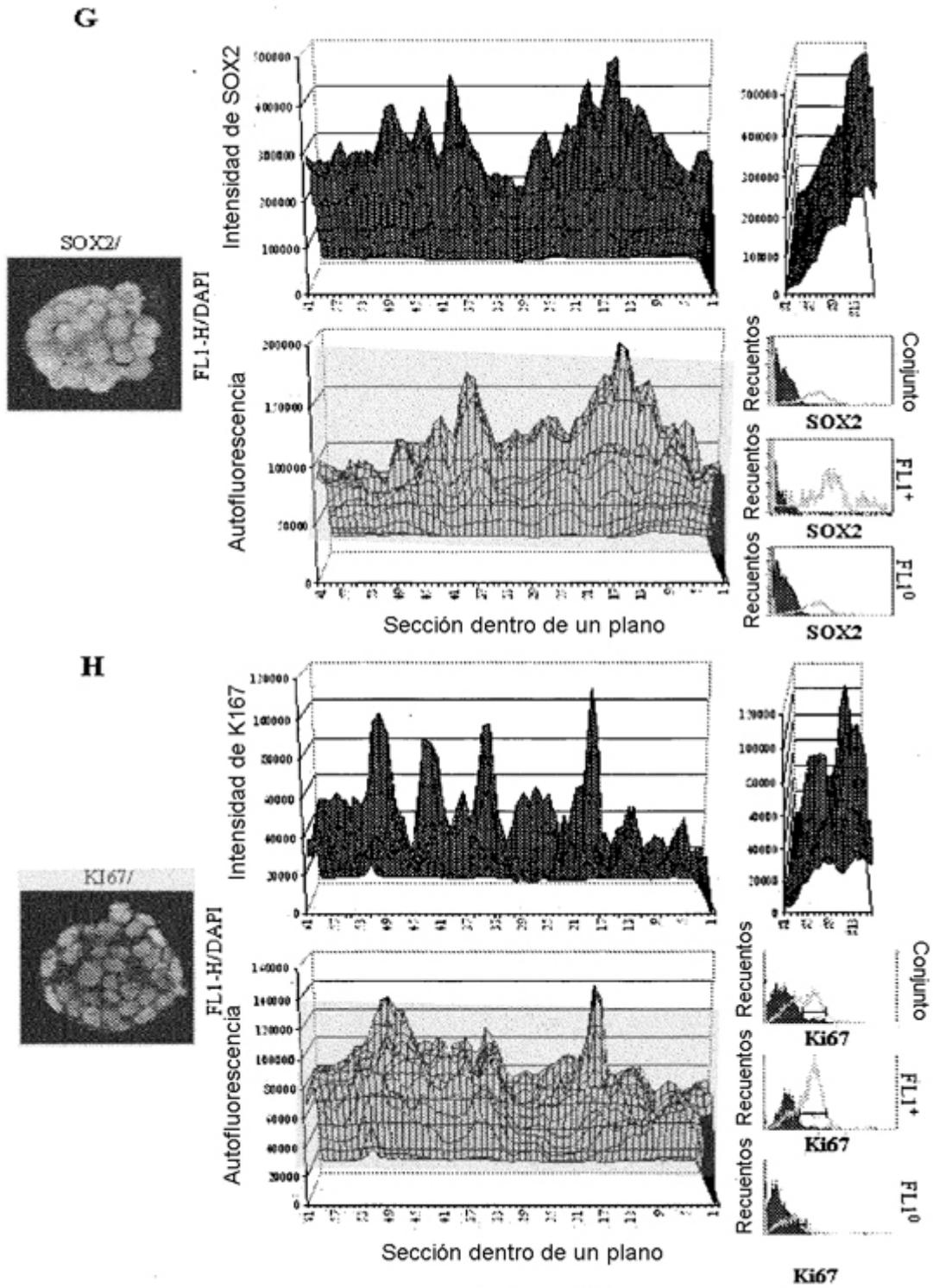


Figura 11

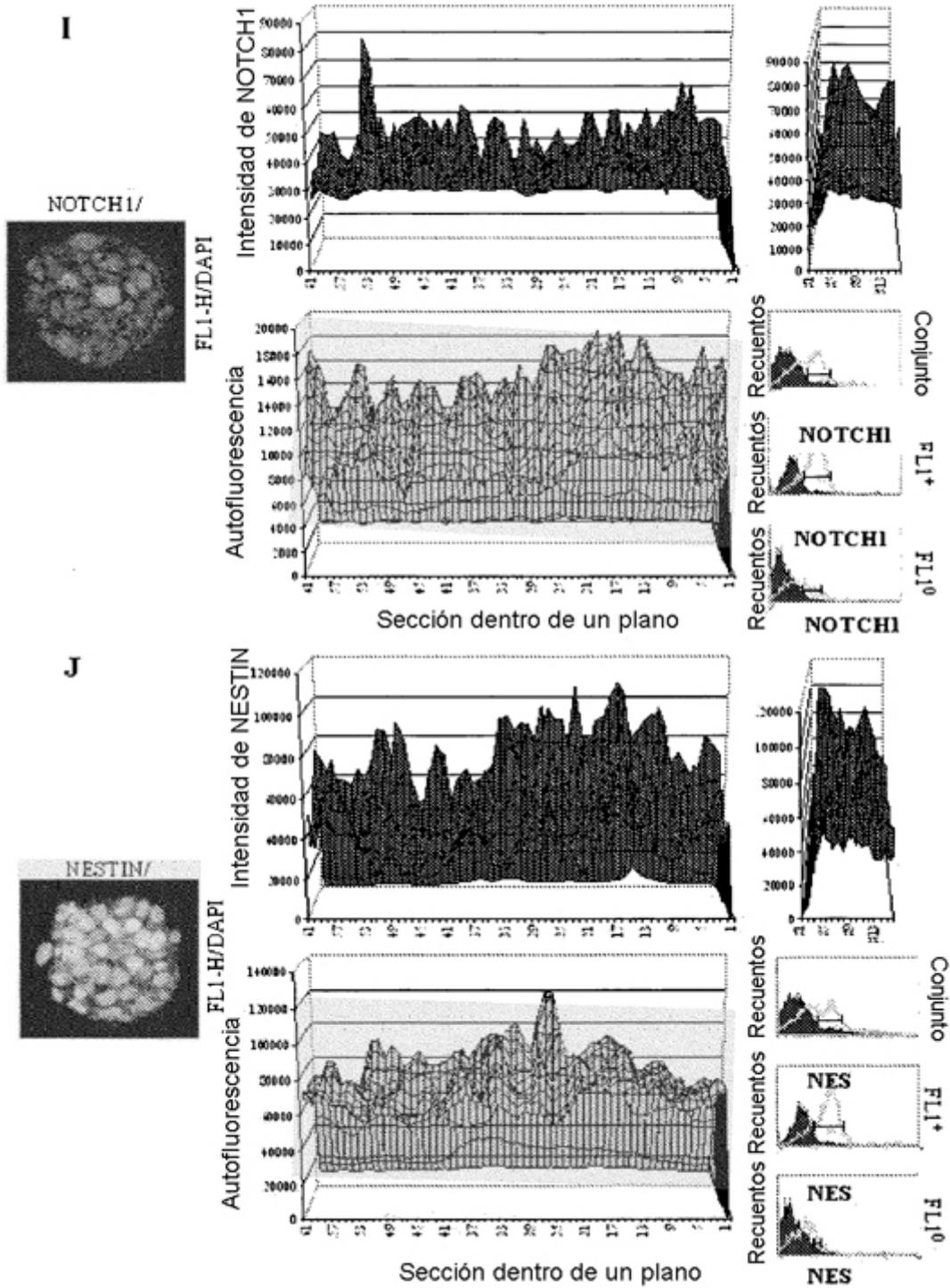


Figura 11

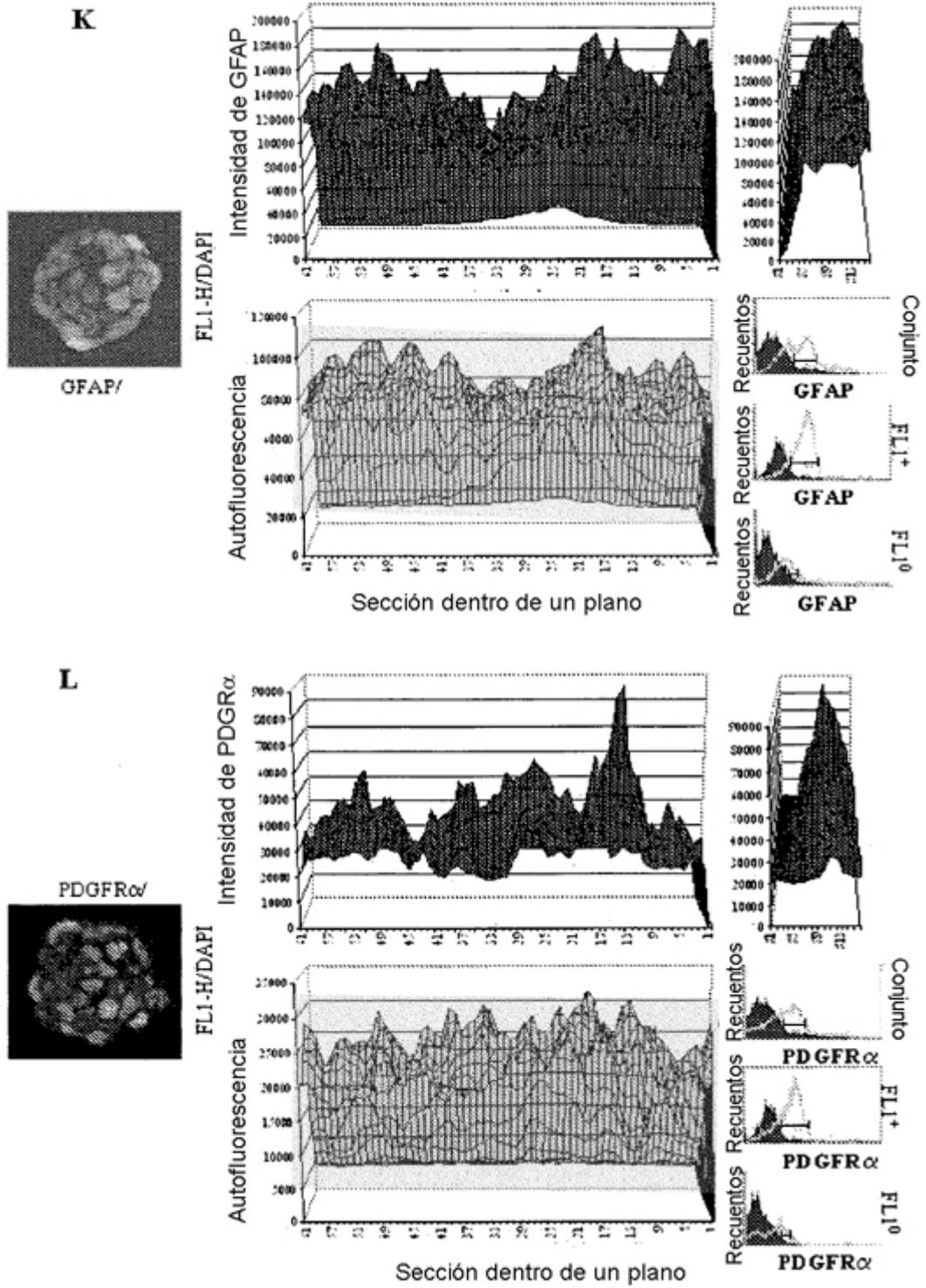


Figura 11

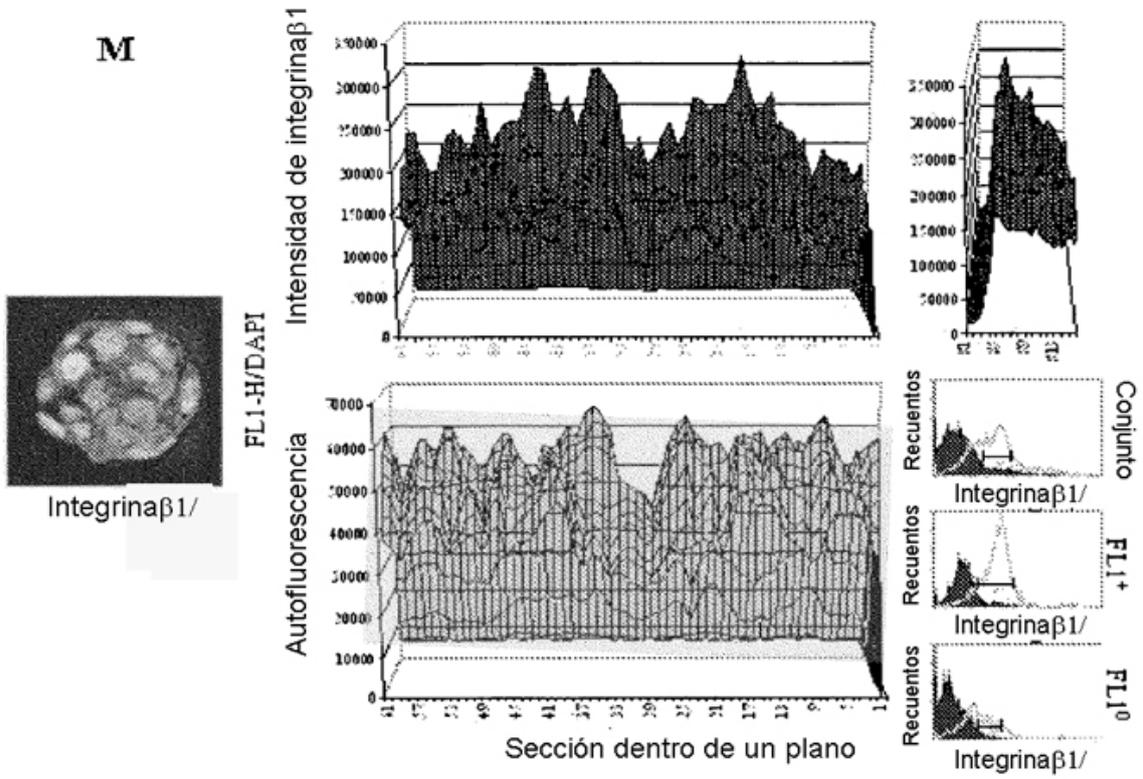


Figura 11

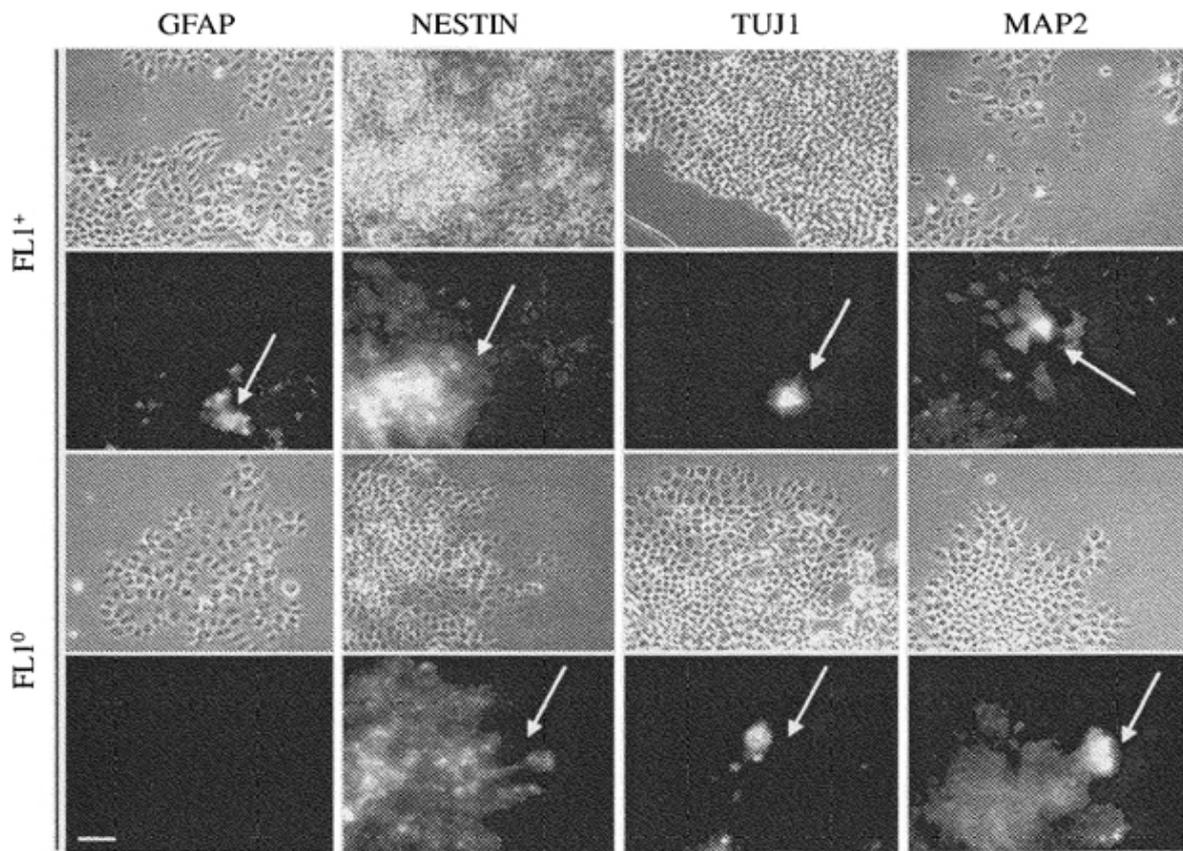
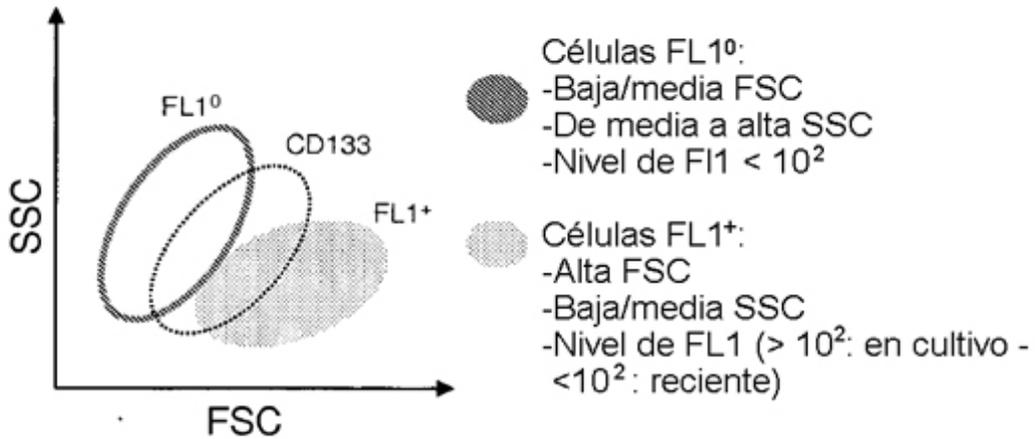


Figura 12



B

	 FL1 ⁰	 FL1 ⁺
Tumorigenicidad	-	+
Autorrenovación a largo plazo	-	+
Multipotencia	+	+
Enriquecimiento para la expresión de genes de capacidad de células madre (niveles de ARN de NANOG, OCT4, SOX2, NOTCH1)	+	+++
Enriquecimiento para la expresión de proteínas de capacidad de células madre (NANOG, OCT4, SOX2, NOTCH1)	+	+
Actividades del ciclo celular (% de células en fase G2/M)	+	+++
Actividades y contenidos metabólicos (contenido en NADH, LDH)	+	+++

Figura 13

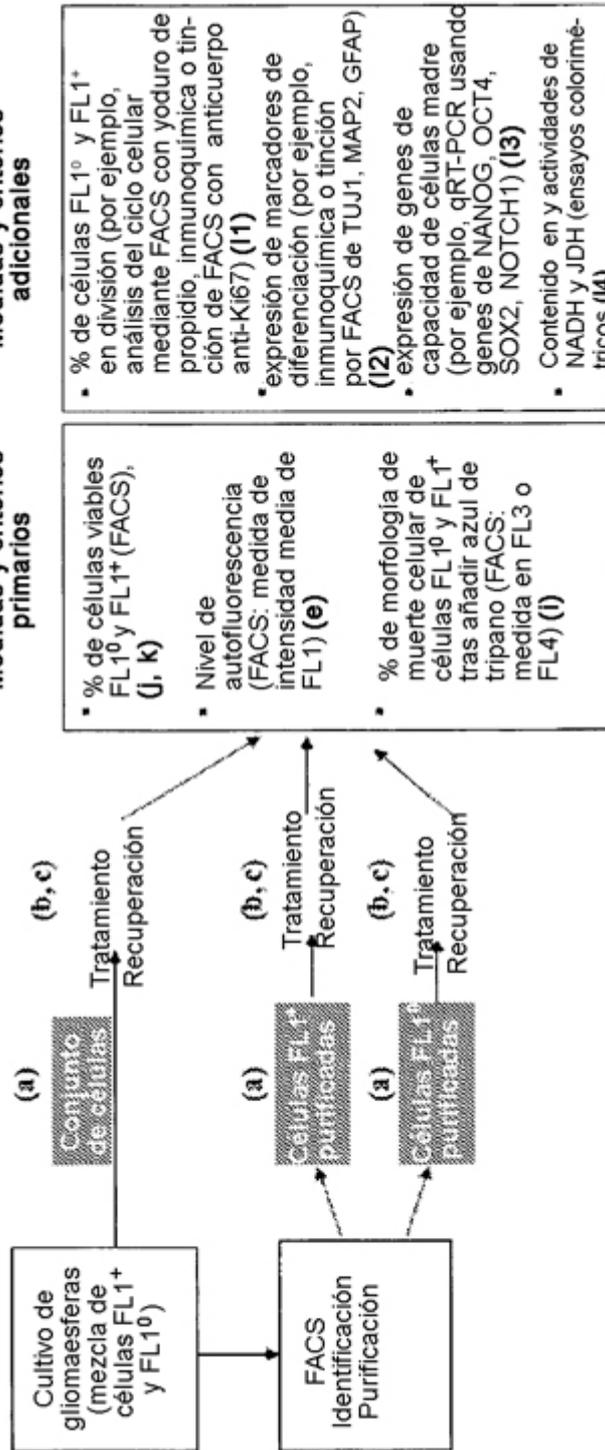


Figura 14