

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 599**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2012** E 12760950 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** EP 2689249

54 Título: **Ensayo para cribar compuestos que disminuyen selectivamente el número de células madre de cáncer**

30 Prioridad:

24.03.2011 US 201161467265 P

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

17.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SMITH, BARRY;
CORDON-CARDO, CARLOS;
PETRYLAK, DANIEL;
DOMENECH, JOSEP y
MARTIN, MIREIA, CASTILLA**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 586 599 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo para cribar compuestos que disminuyen selectivamente el número de células madre de cáncer

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a, entre otras cosas, métodos que son útiles, por ejemplo, para identificar agentes que disminuyen selectivamente el número de células madre de cáncer en una población de células.

10 **Antecedentes**

[0002] El cáncer es un término usado para definir un grupo de enfermedades caracterizadas por proliferación celular no regulada, diferenciación aberrante y apoptosis defectuosa. Estas enfermedades neoplásicas pueden todas tener en común un evento transformante inicial que es de naturaleza variada (por ejemplo, infección viral, carcinógenos químicos, etc.) y afecta a una célula de tejido única, la llamada "célula madre adulta". Se cree que estos eventos transformantes generan una "célula madre de tumor/cáncer (CSC, *cancer stem cell*)" que es responsable de la iniciación tumoral y de la organización jerárquica del cáncer. Sin embargo, tal célula todavía no se ha identificado definitivamente ni caracterizado posteriormente.

[0003] Los tumores consisten en poblaciones heterogéneas de células que se diferencian en las capacidades de crecimiento, morfología y expresión de marcadores. La hipótesis de las células madre de cáncer plantea que, además de CSC, los tumores comprenden una pequeña población de clonógenos amplificadores del tránsito, y grandes conjuntos de células malignas diferenciadas (Reya *et al.*, 2008; Jordan *et al.*, 2006; Dalerba *et al.*, 2007; Vermeulen *et al.*, 2008). Las células madre de cáncer, al igual que sus homólogos de célula madre normal, deben ser no diferenciadas y mostrar división celular asimétrica, produciendo la autorrenovación y producción de clonógenos diferenciados, que así contribuyen a la heterogeneidad del tumor. Además, se ha postulado que las CSC son resistentes a los tratamientos de quimioterapia convencionales, aunque tales tratamientos producen frecuentemente la erradicación de las células que se dividen más rápidamente, produciendo respuesta tumoral, pero no la disminución de CSC (Gupta *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010; Bao *et al.*, 2006; Trumpp *et al.*, 2008; Dean *et al.*, 2005; Costello *et al.*, 2000; Guzman *et al.*, 2002). Este modelo explica por qué la quimioterapia del cáncer humano convencional frecuentemente produce encogimiento del tumor inicial, aunque la mayoría de los cánceres vuelven a aparecer con el tiempo debido a la regeneración por CSC supervivientes. Así, desde un punto de vista clínico, la identificación y caracterización molecular de CSC tiene implicaciones fundamentales para el diagnóstico, pronóstico y enfoques terapéuticos novedosos del cáncer, que incluyen tratamientos dirigidos.

[0004] En tumores sólidos, se ha sostenido previamente que las CSC se identifican por inmunofenotipificación de la superficie celular y capacidad de iniciación tumoral. Se mostró que estas supuestas subpoblaciones de CSC mostraban un fenotipo CD44⁺/CD24^{-/bajo} y α6-integrina en cáncer de mama (Al-Hajj *et al.*, 2003; Cariati *et al.*, 2008; Fillmore *et al.*, 2008; Ponti *et al.*, 2005), un fenotipo CD133⁺/Nestina⁺ en tumores cerebrales (Singh *et al.*, 2004) y un fenotipo CD133⁺ en cáncer de colon (Ricci-Vitiani *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2007), entre otros. En cáncer de próstata también se ha descrito una subpoblación similar de supuestas CSC que expresan altos niveles de CD44 (Collins *et al.*, 2005; Patrawala *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Patrawala *et al.*, 2007). Quizás la cuestión más desafiante a la que se enfrenta el campo es que las subpoblaciones de CSC descritas no siempre cumplen las propiedades clásicas que definen la "estaminalidad", principalmente la capacidad para generar progenie diferenciada por división celular asimétrica. Además, la existencia de las subpoblaciones de fenotipo superficial anteriormente mencionadas varían espectacularmente en muestras de tejido tumoral de pacientes con el mismo diagnóstico histopatológico. En algunos casos, estas subpoblaciones son relativamente raras, mientras que en otros constituyen una gran fracción de masa tumoral (Quintana *et al.*, 2008; Rosen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Shmelkov *et al.*, 2008). Estas observaciones resaltan la complejidad de una identificación coherente de CSC.

[0005] La falta de consistencia en identificar CSC por sus características tales como la estaminalidad ha hecho insostenible una búsqueda fiable de agentes que se dirigen a CSC. En particular, no ha sido factible la identificación de agentes que pueden modular de diferenciación u otros procesos que afectan el porcentaje de CSC en una población de células.

55 **Sumario de la invención**

[0006] Una realización de la presente invención es un método para identificar un agente que disminuye selectivamente el número de células madre de cáncer (CSC). Este método comprende:

- 60
- a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato; y
 - b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento de la CSC o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato, en el que la CSC es una célula cancerosa que es HLA⁺.
- 65

[0007] Otra realización de la invención es un método de cribado de alto rendimiento para identificar agentes que disminuyen selectivamente el porcentaje de células madre de cáncer (CSC) en una población de células. Este método de cribado comprende:

- 5 a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato;
 b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato:
- 10 i. comparando el porcentaje de CSC en una población de células, que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células, que no se trata con el agente candidato;
 ii. determinando el porcentaje de células viables en la población de células tratadas y no tratadas,
 iii. determinando el porcentaje de células no CSC en la población de células tratadas y no tratadas; y
 iv. determinando el porcentaje de células en división en la población de células tratadas y no tratadas,
- 15 en el que un agente candidato que (1) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la viabilidad celular; (2) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la viabilidad celular; (3) disminuye el porcentaje de CSC y aumenta el porcentaje de no CSC; (4) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la división celular; o (5) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la división celular es un agente que disminuye selectivamente el porcentaje de CSC; en el que la CSC es una célula cancerosa que es HLA⁻.

[0008] Otra realización de la invención es un método de cribado de alto rendimiento para identificar agentes que disminuyen selectivamente el porcentaje de células madre de cáncer (CSC) en una población de células, en el que las CSC son resistentes a quimioterapia convencional. Este método de cribado comprende:

- 25 a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato, en el que la CSC tiene las siguientes propiedades: HLA I⁺ y HLA II⁺;
 b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato:
- 30 i. comparando, usando citometría de flujo, el porcentaje de CSC en la población de células, que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células, que no se trata con el agente candidato;
 ii. determinando, usando un ensayo de viabilidad celular, el porcentaje de células viables en la población de células tratadas y no tratadas,
 35 iii. determinando, usando un ensayo de diferenciación celular, el porcentaje de células no CSC en la población de células tratadas y no tratadas; y
 iv. determinar, usando un ensayo de división celular, el porcentaje de células en división en la población de células tratadas y no tratadas,
- 40 en el que un agente candidato que (1) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la viabilidad celular; (2) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la viabilidad celular; (3) disminuye el porcentaje de CSC y aumenta el porcentaje de no CSC; (4) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la división celular; o (5) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la división celular es un agente que disminuye selectivamente el porcentaje de CSC.

[0009] Otra realización es un agente para destruir selectivamente CSC identificadas por cualquier método de la presente invención.

[0010] Una realización adicional es una composición farmacéutica. Esta composición farmacéutica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente como se desvela en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

[0011] La presente patente o archivo de solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color se proporcionarán por la oficina tras la solicitud y pago de la tasa necesaria.

La Figura 1 muestra la caracterización de resistencia adquirida a docetaxel en células de cáncer de próstata independiente de hormonas. La Figura 1a muestra los resultados de ensayos de viabilidad celular (MT) en las células parentales (22RVI (panel izquierdo) y DU145 (panel derecho)) y células con resistencia adquirida a docetaxel (22RVI-DR y DU145-DR) tratadas con dosis crecientes de docetaxel. Una línea roja designa la concentración CI_{50} de fármaco (docetaxel) para células sensibles y resistentes. La CI_{50} de docetaxel en 22RVI-DR aumentó de 25 nM a 10 μ M (aumento de 400 veces) y la CI_{50} de docetaxel en DU145-DR aumentó de 5 nM a 1 μ M (aumento de 200 veces). Los paneles izquierdos de la Figura 1b muestran el análisis cuantitativo de ensayos de formación de colonias en células parentales y resistentes a docetaxel tratadas con dosis crecientes de docetaxel durante 24 horas. Los paneles derechos de la Figura 1b muestran ensayos de formación de

colonias representativas de células tratadas continuamente durante 21 días con docetaxel (25 nM en células 22RV1 y 5 nM en células DU145). No se observaron colonias después de la administración continua de docetaxel en las células sensibles, mientras que se observaron colonias en las células resistentes. Se observaron efectos similares después de la exposición de 24 horas al fármaco. La Figura 1c muestra los resultados de la evaluación por citometría de flujo de la apoptosis por anexina-V y tinción con yoduro de propidio de células expuestas a DMSO (control) y docetaxel. La Figura 1d muestra un análisis por transferencia Western de la escisión de PARP de diversos tipos de células como se indica. Los resultados mostrados en la Figura 1 (c) y (d) demuestran que el fenotipo de resistencia adquirida a docetaxel está asociado a una ausencia de respuesta apoptótica a docetaxel.

La Figura 2 muestra la caracterización fenotípica y la capacidad de iniciación tumoral de células resistentes a docetaxel. La Figura 2a izquierda muestra un diagrama de Venn de genes con al menos un aumento (↑) o disminución (↓) de 2 veces en la expresión de transcritos en el proceso de adquirir resistencia a docetaxel en células DU145 y 22RV1. Genes de solapamiento = 247. La Figura 2a derecha es un histograma que representa la otología génica (GO) de los 247 genes de solapamiento. Se representan las categorías con significación estadística ($p \leq 0,01$). Las categorías de GO marcadas con un asterisco negro (*) se refieren a la proliferación celular, muerte celular y respuesta a fármacos. Las categorías de GO marcadas con un asterisco rojo (*) se refieren a procesos de desarrollo. La Figura 2b muestra el mapa de calentamiento de genes en desarrollo, organizado por agrupamiento jerárquico usando Cluster y Treeview. La codificación de color en rojo indica altos niveles de expresión y la codificación en verde indica bajos niveles de expresión. Los valores de las señales se han transformado con \log_2 . La Figura 2c muestra inmunotransferencia y cuantificación de proteína de lisados celulares de células parentales y resistentes a docetaxel emparejadas para marcadores de diferenciación epitelial, marcadores relacionados con la próstata, antígenos de la clase I del MHC, proteínas de la vía WNT/ β -catenina, proteína de señalización NOTCH y proteínas de la vía de señalización de Hedgehog. La Figura 2d muestra el análisis de inmunofluorescencia en células parentales y resistentes a docetaxel DU145 (2d) y 22RV1 (2d continuación) de la expresión y localización subcelular de CK y antígenos de la clase I de HLA, además de diversos factores de transcripción (β -catenina desfosforilada, NOTCH 2 escindido, Gli1 y Gli2). La localización nuclear de factores de transcripción en desarrollo en células resistentes a docetaxel se observa tras la comparación con sus células parentales. Se muestra una ausencia de expresión de CK. La Figura 2e proporciona histogramas que muestran la capacidad de iniciación tumoral y tablas que resumen la capacidad de iniciación tumoral y las latencias tumorales después de la inyección de células parentales y resistentes a docetaxel en ratones NOD/SCID. *se corresponde con $p < 0,001$ y **se corresponde con $p < 0,05$. La Figura 2f muestra el análisis de inmunofluorescencia en células parentales y resistentes a docetaxel DU145 y 22RV1 de la expresión y localización subcelular de CK y antígenos de la clase I de HLA.

La Figura 3 muestra la identificación de una subpoblación citoqueratina negativo en células sensibles a docetaxel parentales. Las Figuras 3a y 3b muestran análisis de citometría de flujo y de inmunofluorescencia de la expresión de CK (18 y 19) en células parentales (22RV1 y DU145). La representación del análisis de citometría de flujo mostrada en la columna (1) para las células de control (no teñidas), teñidas CK18, CK19 y CK18+19 es representativa de la población. La columna (2) muestra la cuantificación de células CK- en tres experimentos independientes. La columna (3) muestra la tinción por inmunofluorescencia para CK 18 (rojo), CK19 (verde) y CK18+19. La flecha blanca indica una célula CK negativo en ambas líneas celulares parentales. La Figura 3c es una representación esquemática de las dos hipótesis de trabajo iniciales: transición frente a enriquecimiento de células madre de cáncer por docetaxel.

La Figura 4 muestra la generación y validación del plásmido que contiene el promotor de GFP que conduce la expresión de CK19 y que la quimioterapia enriquece en células madre de cáncer con un fenotipo CK-negativo/HLA-negativo. La Figura 4a muestra una ilustración esquemática de la construcción de promotor de CK19-indicador de GFP generada. Se amplificó una región de 1768 pb correspondiente al promotor de la citoqueratina 19 humano por PCR usando ADN genómico de células DU145. La región promotora incluye 1142 pb de la región 5' UTR, 480 pb que pertenecen al exón 1 y 146 pb que pertenecen al intrón 1. El producto de PCR se clonó en pEGFPN1. La construcción resultante tiene el promotor de CK19 en la dirección 5' de la región codificante de la proteína GFP y regula su expresión. La Figura 4b muestra la co-tinción por inmunofluorescencia para CK (rojo) y la clase I de HLA (verde) de células parentales DU145 y 22RV1. La flecha blanca en el panel de combinación indica una célula con un fenotipo CK-negativo/clase I de HLA-negativo. El análisis de citometría de flujo representativo muestra dos poblaciones de células distintas: una población principal de células CK-positivo/HLA-positivo y una población de células más pequeña con un fenotipo CK-negativo/HLA-negativo. La Figura 4c muestra los resultados de PCR de células GFP+ y GFP- clasificadas transfectadas establemente con el plásmido. La PCR confirma la integración estable de la construcción de indicador de CK19 en células clasificadas DU145 GFP+ y GFP-. Un fragmento de la secuencia de GFP se amplificó por PCR usando ADN genómico como molde a partir de células DU145 GFP+ y GFP- clasificadas transfectadas establemente con el plásmido indicador. Como control de PCR negativo se usaron células parentales DU145 no transfectadas.

La Figura 5 muestra que la quimioterapia enriquece las células madre de cáncer con un fenotipo CK19-negativo, GFP negativo. La Figura 5a muestra una representación esquemática de la hipótesis de trabajo. La Figura 5b muestra imágenes en serie representativas de células establemente transfectadas tratadas con docetaxel (10 nM) en diversos momentos de tiempo como se indica. Se trataron células estables DU145 no clasificadas-promotor de CK19-GFP con docetaxel (10 nM) durante 48 h y se grabaron por microscopía de lapso de tiempo para estudiar su comportamiento. Se incluyen imágenes en serie de un experimento representativo en el que una flecha negra indica una célula GFP- que experimenta división celular y sobrevive a quimioterapia, mientras que

las células que expresan GFP empiezan a morir después de la parada mitótica. La Figura 5c muestra análisis de citometría de flujo representativo y cuantificación del porcentaje de células GFP- y GFP+ que sobreviven después de 48 horas de tratamiento con docetaxel. Las células del panel (c) se analizaron para la expresión de GFP por citometría de flujo después de 48 horas de tratamiento con docetaxel 10 nM. Representaciones representativas y la cuantificación de tres experimentos independientes muestran que hay un desplazamiento en el porcentaje de poblaciones de células GFP- y GFP+ que sobreviven al tratamiento en comparación con células sin tratar (control). La Figura 5d muestra un ensayo de formación de colonias representativo y la cuantificación de células GFP-/HLA- y GFP+/HLA+ clasificadas continuamente tratadas con docetaxel (10 nM). Se realizaron tres experimentos independientes de células estables DU145 clasificadas con GFP/HLA-promotor de CK19-GFP (GFP+/HLA+ y GFP-/HLA-) continuamente cultivadas con docetaxel 10 nM o en ausencia del fármaco (control). *se corresponde con $p < 0,001$.

La Figura 6 muestra la caracterización de características de células madre de cáncer: división celular asimétrica, iniciación y diferenciación tumoral. La Figura 6a muestra imágenes en serie representativas de células establemente transfectadas que representan una célula GFP- (CK-negativo/clase I de HLA-negativo) que experimentan división asimétrica. Las células estables DU145 no clasificadas y no tratadas-promotor de CK19-GFP se grabaron por microscopía de lapso de tiempo durante 24 horas. Las imágenes en serie de un experimento representativo muestran una célula GFP-(CK-negativo) que se divide asimétricamente y que produce una célula hija GFP+. La Figura 6b muestra análisis de citometría de flujo representativo y cuantificación de poblaciones de GFP de células derivadas de células clasificadas GFP-negativo y GFP-positivo en diferentes momentos de tiempo. Las células estables DU145-promotor de CK19-GFP se clasificaron por GFP y las células GFP+ y GFP- se sembraron por separado y se cultivaron durante diferentes periodos de tiempo. Representación del análisis de citometría de flujo representativo y cuantificación de tres experimentos independientes de células cultivadas derivadas de células clasificadas GFP- y GFP+ en diferentes momentos de tiempo (día 1, 2 semanas, 4 semanas). La Figura 6c muestra una representación esquemática del diseño experimental y los resultados, además del análisis por inmunofluorescencia de marcadores de diferenciación (GFP, CK y clase I de HLA) en un xenoinjerto de tumor generado a partir de células GFP-negativo/CK-negativo/clase I de HLA-negativo. La representación esquemática del diseño experimental muestra la inyección de células estables DU145 clasificadas por GFP/HLA-promotor de CK19-GFP en ratones NOD/SCID y los tumores resultantes. Se realizaron tres experimentos independientes que incluyeron 8 ratones para cada población de células clasificada (por ejemplo, GFP-negativo/clase I de HLA-negativo) y dilución de células (10, 100 y 1000 células). Se muestra el análisis de inmunofluorescencia representativo de marcadores de diferenciación (GFP, CK y clase I de HLA) en un tumor de xenoinjerto generado a partir de células GFP-negativo/CK-negativo/clase I de HLA-negativo. La Figura 6d muestra latencias tumorales y la cuantificación de la capacidad de iniciación tumoral después de la inyección de células clasificadas GFP+/HLA+ y GFP-/HLA- en ratones NOD/SCID. *se corresponde con $p < 0,001$ y **se corresponde con $p < 0,05$. La barra se corresponde con 100 μm .

La Figura 7 muestra la identificación de células madre de cáncer en tejidos humanos de cáncer de próstata primario y metastásico. La Figura 7a muestra la expresión inmunohistoquímica de CK18 y CK19 en muestras representativas de tejido de dos pacientes (paciente 1 con tumores primarios y metastásicos emparejados). Los histogramas muestran el porcentaje de células CK-negativo y positivo en muestras primarias ($n=6$) y metastásicas ($n=20$) de tejido de pacientes independientes. Las Figuras 7b-7d muestran la cuantificación de células CK-negativo y positivo en las muestras de tejido analizadas, además del análisis de co-expresión basado en inmunofluorescencia representativo de CK (CK18+19) y antígenos de la clase I de HLA (Figura 7b), factores de transcripción (Notch-2 escindido, β -catenina activa, Gli1 y Gli2) (Figura 7c) y receptor de andrógenos (AR) (Figura 7d). La tinción nuclear de factores de transcripción se muestra en las células tumorales CK-negativo/HLA-negativo identificadas. La barra se corresponde con 100 μm .

La Figura 8 muestra la capacidad de clonabilidad de células clasificadas por la clase I de HLA. Se realizaron el ensayo de formación de colonias por dilución representativo (10, 100 y 1000 células) de células DU145 clasificadas por clase I de HLA y la cuantificación de tres experimentos independientes. Las células clasificadas clase I de HLA-negativo mostraron una formación de colonias estadísticamente significativa mayor cuando se comparó con las células clasificadas HLA-clase I-positivo. *se corresponde con $p < 0,05$.

La Figura 9 muestra que las células tumorales epiteliales clase I de HLA-negativo de diferentes tipos de cáncer humano fresco tienen capacidad de iniciación tumoral en ratones NOD/SCID. La Figura 9a muestra un diagrama de clasificación representativo de células tumorales clase I de HLA-negativo y positivo. La Figura 9b muestra la capacidad de iniciación tumoral y las latencias tumorales después de los ensayos de dilución de células clasificadas por HLA de cáncer de próstata humano. Los gráficos y tablas correspondientes resumen la capacidad de iniciación tumoral y la latencia tumoral de diferentes diluciones (10, 100 y 1000 células inyectadas) de células clasificadas por HLA (HLA- y HLA+) de cáncer de próstata humano y células no clasificadas, directamente a partir de muestras humanas frescas (inyecciones primarias) y xenoinjertos derivados (inyecciones secundarias) en ratones NOD/SCID. Se inyectaron dos veces cuatro ratones para cada población de células clasificadas y dilución de células en los flancos superiores (HLA-negativo) y los flancos inferiores (HLA-positivo). La Figura 9c muestra la formación de xenoinjerto de tumor representativa en un ratón NOD/SCID inyectado con 10^2 células clase I de HLA-negativo (arriba) y clase I de HLA-positivo (abajo). Se confirmó que los tumores que surgieron de la inyección eran cáncer de próstata por estudios histológicos (H&E) y de inmunofluorescencia (CK, receptor de andrógenos (AR) y antígeno prostático específico de membrana (PSMA)) realizados en un tumor primario humano y los que surgieron de tumores de xenoinjerto de inyecciones primarias y secundarias. La Figura 9d muestra histogramas que representan la capacidad de iniciación tumoral y las latencias tumorales

después de los ensayos de dilución de otras células clasificadas por HLA de cánceres humanos (colon, pulmón, mama y vejiga). Se hicieron inyecciones primarias y secundarias de 100 células clasificadas por HLA de los otros tipos de cáncer humano. Se inyectaron dos veces cuatro ratones para cada población de células clasificadas y dilución de células en los flancos superiores (HLA-negativo) y los flancos inferiores (HLA-positivo). La Figura 9e muestra la caracterización histológica (H&E) de xenoinjertos primarios humanos y derivados emparejados. *se corresponde con $p < 0,001$, **se corresponde con $p < 0,05$ y ***se corresponde con $p > 0,05$. La barra se corresponde con 100 μm .

La Figura 10 muestra efectos *in vitro* e *in vivo* de la inhibición de la vía de NOTCH y de Hedgehog en las células madre de cáncer identificadas. La Figura 10a muestra el análisis del ciclo celular representativo y la cuantificación de los efectos sub-G1 observados en células tumorales clasificadas HLA-negativo y positivo parentales (DU145 y 22RV1) cuando se exponen durante 72 horas a ciclopamina (C), el compuesto-E (CE) solo o en combinación (C+CE). La Figura 10b muestra ensayos de formación de colonias representativos y la cuantificación de células tumorales HLA-negativo y positivo clasificadas parentales (DU145 y 22RV1) cuando se exponen continuamente a dexametasona (D) y la combinación de los mismos fármacos que en la Figura 10a. La Figura 10c muestra la capacidad de iniciación tumoral y las latencias después de la inyección de 10^3 células clasificadas HLA-negativo 22RV1 y DU145 en ratones NOD/SCID expuestas a solución de vehículo (control), dexametasona (D), ciclopamina más dexametasona (D+C), DBZ más dexametasona (D+DBZ) o en combinación triple (D+C+DBZ). Se realizaron tres experimentos independientes que incluyeron 8 ratones para cada línea celular clasificada por HLA y tratamiento (por ejemplo, ciclopamina). La Figura 10d muestra la capacidad de iniciación tumoral y las latencias después de la inyección de 10^3 células clasificadas HLA-negativo de xenoinjertos de cáncer de próstata humano N.^o 5, N.^o 9 y N.^o 2 en ratones NOD/SCID expuestos a los mismos fármacos y concentraciones que en la Figura 10c. El experimento incluyó 8 ratones para cada caso de cáncer de próstata y tratamiento. *se corresponde con $p < 0,05$.

La Figura 11 muestra que células tumorales que carecieron de citoqueratinas mostraron un fenotipo AR negativo. La Figura 12 muestra la reversibilidad de la resistencia a docetaxel adquirida en células de cáncer de próstata. La Figura 12a muestra la cuantificación del porcentaje de viabilidad celular de los ensayos de viabilidad celular (MT) en células resistentes a docetaxel (22RV1-DR y DU-145-DR) y células resistentes a docetaxel cultivadas sin fármaco durante diversos periodos de tiempo (4, 8 y 12 semanas). Una línea roja indica la concentración CI_{50} del fármaco (docetaxel) para células con resistencia adquirida y con resistencia invertida. Las células con resistencia adquirida a docetaxel cultivadas sin fármaco fueron progresivamente más sensibles a docetaxel, de una manera dependiente del tiempo. Después de 12 semanas de retirada del fármaco, la CI_{50} de docetaxel en 22RV1-DR disminuyó de 10 μM a 50 nM y la CI_{50} de docetaxel en DU145-DR disminuyó de 1 μM a 25 nM. El panel derecho de la Figura 12b muestra el análisis cuantitativo de ensayos de formación de colonias de células resistentes a docetaxel y células resistentes a docetaxel cultivadas sin fármaco tratadas con dosis crecientes de docetaxel durante 24 horas. El panel izquierdo de la Figura 12b muestra el ensayo de formación de colonias representativo de células tratadas continuamente con docetaxel. Los resultados confirman la reversibilidad de la resistencia a docetaxel adquirida debido a que las células resistentes invertidas forman menos colonias cuando se tratan con docetaxel.

La Figura 13 muestra la reversibilidad de la resistencia a docetaxel asociada a una recuperación en el fenotipo de células diferenciadas en células DU145 y 22RV1. El panel izquierdo de la Figura 13 muestra el análisis de transferencia Western y los paneles derechos de la Figura 13 muestran el histograma de cuantificación de proteína de la expresión de marcadores de diferenciación epitelial (CK18 y CK19) y antígenos de la clase I de HLA en células parentales sensibles, células con resistencia adquirida a docetaxel y células con resistencia invertida a docetaxel. Las células con resistencia invertida muestran mayores niveles de expresión de proteína que las células con resistencia adquirida a docetaxel, alcanzado niveles similares a aquellos observados en las células parentales sensibles.

La Figura 14 muestra la generación y la validación del plásmido que contiene un promotor de CK19 que conduce la expresión de GFP. La Figura 14a muestra la tinción por inmunofluorescencia para CK19 (rojo) y GFP (verde) de células DU145 parentales transfectadas establemente con el plásmido pCK19-GFP. Una flecha blanca en el panel combinado indica una célula que carece de la expresión de CK19 y GFP. La cuantificación por citometría de flujo confirma que hay una co-expresión de CK endógena y GFP, validando así el uso de la expresión de GFP como lectura de la expresión de CK en esta línea celular estable. La Figura 14b muestra la tinción por inmunofluorescencia para la clase I de HLA (rojo) y GFP (verde) de células DU145 parentales transfectadas establemente con el plásmido pCK19-GFP. Una flecha blanca en el panel combinado indica una célula que carece de la expresión de la clase I de HLA y GFP. La cuantificación por citometría de flujo confirma la co-expresión de GFP y antígenos de la clase I de HLA. Las células que expresan GFP son la clase I de HLA-positivo, mientras que las células que no expresan GFP también son la clase I de HLA-negativo.

La Figura 15 muestra la capacidad de iniciación tumoral de células clasificadas por la clase I de HLA. Se clasificaron las células parentales DU145 y 22RV1 por expresión del marcador HLA. Se inyectaron dos diluciones de células diferentes (10 y 100 células) de poblaciones HLA-negativo y HLA-positivo en ratones NOD/SCID. Se realizaron tres experimentos independientes que incluyeron 8 ratones para cada línea celular clasificada y dilución de células. Los gráficos de los paneles superiores y las tablas correspondientes de los paneles inferiores resumen la capacidad de iniciación tumoral y la latencia tumoral, respectivamente, de estos tres experimentos independientes. En ambas líneas celulares, solo la inyección de 10 células clasificadas HLA-negativo muestra capacidad tumorigénica, mientras que 10 células HLA-positivo no forman tumores. *se corresponde con $p < 0,0001$.

La Figura 16 muestra la cuantificación de subpoblaciones GFP/HLA en xenoinjertos de tumor generados a partir de la inyección de células clasificadas GFP-negativo/HLA-negativo. La representación del análisis de citometría de flujo representativo y la cuantificación de subpoblaciones GFP/HLA de células en xenoinjertos de tumor muestran que se observan dos poblaciones de células distintas: una población principal de células GFP-positivo/HLA-positivo y una población más pequeña de células con un fenotipo GFP-negativo/HLA-negativo.

Descripción detallada de la invención

[0012] Se ha descubierto una CSC que es resistente a quimioterapia convencional. Aunque la quimioterapia erradica ciertas subpoblaciones de células tumorales que incluyen células en división, no disminuye la población de CSC identificada. Esto proporciona una explicación de por qué la quimioterapia convencional frecuentemente produce un encogimiento tumoral inicial, sin embargo, la mayoría de los cánceres con el tiempo vuelven a aparecer debido a la regeneración por CSC supervivientes. El identificar un agente que reduzca o erradique el número de CSC como se define en el presente documento avanzaría el campo de la terapia del cáncer.

[0013] Según la presente invención se ha desarrollado un método para identificar un agente que disminuye selectivamente el número de células madre de cáncer ("CSC") que tienen las características fenotípicas y quimiorresistencia funcional de las CSC que se identifican en el presente documento. Los cribados *in vitro* de la presente invención proporcionan un ensayo para probar agentes candidatos para identificar aquellos que pueden reducir la supervivencia o el crecimiento de la CSC o aumentar la diferenciación de la CSC. La implementación de los ensayos permite probar una amplia variedad de agentes candidatos y facilitar la identificación de agentes con un supuesto efecto inhibidor de CSC.

[0014] Por consiguiente, una realización de la presente invención es un método para identificar un agente que disminuye selectivamente el número de células madre de cáncer (CSC). Este método comprende:

- a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato; y
- b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento de la CSC o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato.

[0015] Una célula madre de cáncer ("CSC") es una célula cancerosa que es HLA⁻. Tales células se definen adicionalmente por ser al menos una de CD24⁻, CD133⁻, Notch⁺, Gli1⁺, Gli2⁺, proteína ácida fibrilar glial (GFAP⁺), Neurofil y citoqueratina⁺. Además, también se contemplan combinaciones de cualquiera o de todos de los anteriores. Tales CSC se definen adicionalmente por tener al menos una de las siguientes propiedades adicionales: capacidad de autorrenovación, experimentan división celular asimétrica, tienen capacidad tumorigénica, tienen potencial metastásico, tienen propiedades de multi-diferenciación, son sensibles a inhibidores Notch y Hedgehog, y tienen amplia quimiorresistencia. Además, también se contemplan combinaciones de cualquiera o de todos de los anteriores. Otras propiedades de CSC se enumeran en, por ejemplo, la Tabla 1. La combinación de cualquiera de las características identificadas en la Tabla 1 junto con HLA⁻ puede ser suficiente para identificar una célula CSC.

[0016] La Tabla 1 resume varios biomarcadores que definen adicionalmente el fenotipo de la célula madre de cáncer. Este fenotipo puede incluir la expresión de vías en desarrollo y biomarcadores de "células madre embrionarias" y "células madre de tejido/adultas", tales como ciertos factores reguladores de homeocaja (por ejemplo, Sox2, Sox4), marcadores de células madre (por ejemplo, Scal, Gata2, Gata3, nestina), factores de transcripción (por ejemplo, Notch-2, Gli1, Gli2, beta-catenina nuclear), división celular asimétrica (por ejemplo, RMND5A) y transportadores de la membrana asociados a resistencia multi-fármaco (por ejemplo, MDRI/P-glicoproteína, MRP1, MRP2, MRP3, ABC3). De relevancia importante, estas CSC tienen en común la falta de expresión de proteínas de histocompatibilidad, que incluyen todas las moléculas de la clase I de HLA y la clase II de HLA, que contribuye a la evasión de la inmunovigilancia del huésped, siendo así crítica para la diseminación metastásica.

[0017] Como se usa en el presente documento, "HLA I" significa que no tiene moléculas de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MHC es un conjunto de moléculas mostradas sobre superficies celulares que son responsables del reconocimiento de linfocitos y la presentación de antígenos. Las moléculas de la clase I del MHC presentan antígeno a linfocitos T citotóxicos. Las moléculas de MHC I se encuentran en casi todos los tipos de células del cuerpo.

[0018] Como se usa en el presente documento, "HLA II" significa que no tiene moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las moléculas de la clase II del MHC presentan antígeno a linfocitos T cooperadores. Las moléculas de MHC II solo se encuentran en macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. "HLA" significa preferentemente HLA I y HLA II.

[0019] La identificación de células HLA⁻ de una población de células cancerosas puede llevarse a cabo usando cualquier técnica convencional o conocida que identifica células basándose en, por ejemplo, la expresión, o no expresión, de marcadores superficiales celulares particulares y mantiene la viabilidad de la célula. Preferentemente, la identificación se lleva a cabo por un análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) como se

desvela en más detalle en los ejemplos.

[0020] Como se usa en el presente documento, “capacidad de autorrenovación” significa, por ejemplo, que una CSC tiene la capacidad de pasar por numerosos ciclos de la división celular mientras que mantiene su estado no diferenciado.

[0021] Como se usa en el presente documento, “división celular asimétrica” significa, por ejemplo, capaz de tener una división celular que conduce a dos células con diferentes propiedades, tales como, por ejemplo, una célula que mantiene el fenotipo de CSC mientras que la otra está programada para, por ejemplo, diferenciarse.

[0022] Como se usa en el presente documento, “capacidad tumorigénica” significa, por ejemplo, una célula, tal como una CSC, que tiene la capacidad para generar un tumor cuando se trasplanta en un huésped animal.

[0023] Como se usa en el presente documento, “potencial metastático” significa, por ejemplo, la capacidad de una célula, tal como una CSC, para moverse a una localización secundaria en un cuerpo, es decir, metastatizar, y generar un tumor.

[0024] Como se usa en el presente documento, “propiedades de multidiferenciación” significa, por ejemplo, la capacidad de una célula para diferenciarse en más de un tipo de célula.

[0025] Como se usa en el presente documento, “sensibilidad a inhibidores Notch y Hedgehog” significa una célula, tal como una CSC, que se modula por inhibidores de las vías de Notch y de Hedgehog. Tales inhibidores se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, K. Garber, JNCI, 99(17):1284-1285 (2007) (inhibidores Notch) y Martinson et al., patente de EE.UU. N.º 7.695.965 (inhibidores Hedgehog).

[0026] Como se usa en el presente documento, “quimiorresistencia amplia” significa una célula, tal como una CSC que es resistente a una gama de agentes químicos, tales como, por ejemplo, agentes usados para tratar cánceres. Como se usa en el presente documento, un agente que se usa para tratar cáncer debe interpretarse ampliamente y puede incluir cualquier compuesto de quimioterapia conocido, composición o combinación de los mismos. Por ejemplo, el agente puede ser un fármaco que daña el ADN y/o un agente antimetabólico. Ejemplos no limitantes adicionales del agente incluyen: inhibidores de la microtubulina, inhibidores de la topoisomerasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, mitoxantrona, cisplatino, docetaxel, análogos de colchicinas, harringtonina, homoharringtonina, camptotecina, análogos de la camptotecina, podofilotoxina, y combinaciones de los mismos.

[0027] Como se usa en el presente documento, “una población de células” significa una mezcla de diferentes células. Por ejemplo, las CSC no tienen que aislarse del resto de los tipos de células, tales como, por ejemplo, una población de células cancerosas.

[0028] Como se usa en el presente documento, “una población de células cancerosas” o “una población de células cancerosas/tumorales” debe interpretarse ampliamente para incluir líneas de células cancerosas/tumorales, por ejemplo, aquellas que están fácilmente disponibles, mediante, por ejemplo, la ATCC, y pueden ser inmortales (por ejemplo, pueden propagarse indefinidamente *in vitro*) y muestras de, por ejemplo, material canceroso no inmortal (“muestras no inmortales”) obtenidas de un sujeto, tal como un ser humano, animal veterinario, o animal de investigación tal como un ratón, rata, etc. El material canceroso puede ser células y/o tejido y/o fluido obtenido, por ejemplo, de una biopsia u otro procedimiento quirúrgico, de, por ejemplo, un tumor sólido, un tumor basado en la sangre, o un tumor del sistema nervioso. Ejemplos no limitantes de la fuente del material canceroso también incluyen sangre, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico, ascitis tumoral, y combinaciones de los mismos.

[0029] Así, puede obtenerse una población de células cancerosas recogiendo células cancerosas de un cultivo celular usando técnicas muy conocidas, que incluyen las desveladas en los ejemplos más adelante. Además, puede obtenerse una población de células cancerosas mediante la adquisición de una muestra tumoral de un paciente con cáncer. La población de células cancerosas puede ser células cancerosas primarias o células cancerosas metastásicas. Las células cancerosas pueden derivarse de una variedad de fuentes de tejido, por ejemplo, células de cáncer de próstata, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de colon, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, melanoma o sarcoma. Ejemplos no limitantes adicionales de otros cánceres tales que están dentro del alcance de la presente invención incluyen leucemia, linfoma y glioma.

[0030] La población de células según la invención también puede ser una línea de CSC de mamífero que está enriquecida en células que son HLA I y HLA II. “De mamífero” se refiere preferentemente a ser humano, ratón, u otro mamífero de investigación, tal como, por ejemplo, una rata. Como se usa en el presente documento, “enriquecido” significa una línea de células cancerosas que tiene elevados números de CSC con respecto a una línea celular de control que no se ha tratado con, por ejemplo, un agente usado para tratar cáncer. Los elevados números de CSC pueden ser transitorios, por ejemplo, algunas de las CSC pueden diferenciarse, o pueden ser de una duración más larga. Además, una línea celular tal puede o puede no ser pura, por ejemplo, sustancialmente libre de células HLA⁺.

[0031] Como se observa anteriormente, las CSC pueden tener al menos una de las siguientes propiedades: CD24⁻, CD133⁻, Notch⁺, Gli1⁺, Gli2⁺, GFAP⁻, Neurofil⁻ y citoqueratina⁻. Además, también se contemplan combinaciones de cualquiera o todas de las anteriores. Las CSC pueden tener adicionalmente al menos una de las siguientes propiedades: capacidad de autorrenovación, experimentar división celular asimétrica, tener capacidad tumorigénica, tener potencial metastásico, tener propiedades de multi-diferenciación, sensibles a inhibidores Notch y Hedgehog, y tener amplia quimiorresistencia. Además, también se contemplan combinaciones de cualquiera o todas de las anteriores.

[0032] En un aspecto de esta realización, las CSC pueden ser resistentes a la quimioterapia convencional. Como se usa en el presente documento, “resistente al tratamiento” significa resistente. Por ejemplo, una muestra de células cancerosas/tumorales puede derivarse de una muestra de material canceroso de un sujeto que es resistente a quimioterapia, o las CSC pueden obtenerse de una línea de células cancerosas que es resistente a quimioterapia. Se conocen en la técnica métodos para generar tales líneas de células cancerosas resistentes y se desvelan en más detalle en los ejemplos.

[0033] En otro aspecto de esta realización, un agente candidato está seleccionado del grupo que consiste en un producto químico, un producto biológico, y combinaciones de los mismos. Como se usa en el presente documento, un “producto biológico” significa una sustancia que se deriva de o producida por un organismo vivo o sintetizada para imitar un agente derivado *in vivo* o un derivado o producto del mismo. Un producto biológico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico, un polipéptido o un polisacárido. Un “producto químico” significa una sustancia que tiene una composición química definida y propiedades características y que no es un producto biológico. Ejemplos no limitantes de productos químicos incluyen compuestos orgánicos pequeños y compuestos inorgánicos pequeños. Ejemplos no limitantes de agentes candidatos incluyen inhibidores Hedgehog y Notch como se desvela en los ejemplos en el presente documento.

[0034] En un aspecto adicional de esta realización, la etapa de determinar comprende además comparar el porcentaje de CSC en una población de células que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células que no se trata con el agente candidato, en el que un agente candidato que disminuye el porcentaje de CSC en la población de células tratadas en comparación con el porcentaje de CSC en las células sin tratar es un agente que disminuye selectivamente el número de CSC.

[0035] En otro aspecto de esta realización, la etapa de determinar comprende llevar a cabo un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en análisis de citometría de flujo, un ensayo de viabilidad celular, un ensayo de diferenciación celular, un ensayo de división celular, y combinaciones de los mismos.

[0036] Como se expone anteriormente, la citometría de flujo, tal como FACS, puede usarse para separar y/o identificar CSC de no CSC. También puede usarse para evaluar la viabilidad celular, diferenciación, o división.

[0037] Como se usa en el presente documento, un ensayo de “viabilidad celular” es un ensayo que identifica y/o separa células vivas de células muertas. Un ejemplo no limitante de un ensayo de viabilidad celular se desvela en los ejemplos.

[0038] Como se usa en el presente documento, un ensayo de “diferenciación celular” es un ensayo que identifica y/o separa células diferenciadas o células no diferenciadas basándose en, por ejemplo, marcadores de diferenciación celular, tales como, por ejemplo, expresión de citoqueratina, como se desvela en los ejemplos.

[0039] Como se usa en el presente documento, un ensayo de “división celular” es un ensayo que identifica y/o separa células en división de las células no en división, por ejemplo, realizando un análisis del ciclo celular, como se desvela en los ejemplos.

[0040] En otro aspecto de la realización, la población de células comprende CSC y células madre adultas, y el agente disminuye el número de CSC en la población de células sin disminuir sustancialmente el número de células madre adultas. Como se usa en el presente documento, “células madre adultas” significa células no diferenciadas, encontradas en todo el cuerpo después del desarrollo embrionario, tal como el cuerpo de un ser humano adulto, que se multiplican por división celular para reponer las células que mueren y regenerar tejidos dañados. Las células madre adultas sirven de sistema de reparación del cuerpo. Así, un agente que no disminuye sustancialmente el número de células madre adultas no afectará sustancialmente el sistema de reparación normal del cuerpo.

[0041] Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo usando un cribado de alto rendimiento. Se prefiere un cribado de alto rendimiento para maximizar la capacidad de cribar posibles compuestos o productos biológicos que reducen el número de CSC.

[0042] La expresión “cribado de alto rendimiento” o un “método de cribado de alto rendimiento”, como se usa en el presente documento, define un proceso en el que grandes números de agentes, por ejemplo, compuestos, se prueban rápidamente y en paralelo para la actividad biológica contra moléculas diana o células diana, tales como, por ejemplo, una CSC. En ciertas realizaciones, “grandes números de agentes, por ejemplo, compuestos” pueden

ser, por ejemplo, superiores a 100 o superiores a 300 o superiores a 500 o superiores a 1.000 compuestos. Preferentemente, el proceso es un proceso automatizado.

5 **[0043]** En otro aspecto de esta realización, la etapa de determinar puede comprender además la etapa i y al menos una de las etapas ii, iii y iv, del siguiente modo:

- i. comparar el porcentaje de CSC en una población de células, que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células, que no se trata con el agente candidato;
- 10 ii. determinar el porcentaje de células viables en la población de células tratadas y no tratadas;
- 10 iii. determinar el porcentaje de células no CSC en la población de células tratadas y no tratadas; y
- iv. determinar el porcentaje de células en división en la población de células tratadas y no tratadas;

15 en el que un agente candidato que (1) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la viabilidad celular; (2) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la viabilidad celular; (3) disminuye el porcentaje de CSC y aumenta el porcentaje de no CSC; (4) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la división celular; o (5) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la división celular es un agente que disminuye selectivamente el número de CSC.

20 **[0044]** Preferentemente, la etapa de determinar comprende llevar a cabo un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en análisis de citometría de flujo, un ensayo de viabilidad celular, un ensayo de diferenciación celular, un ensayo de división celular, y combinaciones de los mismos.

25 **[0045]** Otra realización de la presente invención es un método de cribado de alto rendimiento para identificar agentes que disminuyen selectivamente el porcentaje de células madre de cáncer (CSC) en una población de células. Este método de cribado comprende:

- a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato;
- b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato:
- 30 i. comparando el porcentaje de CSC en una población de células que se trata con el agente candidato con el porcentaje de CSC en una población de células que no se trata con el agente candidato;
- ii. determinando el porcentaje de células viables en la población de células tratadas y no tratadas,
- 35 iii. determinando el porcentaje de células no CSC en la población de células tratadas y no tratadas; y
- iv. determinando el porcentaje de células en división en la población de células tratadas y no tratadas,

40 en el que un agente candidato que (1) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la viabilidad celular; (2) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la viabilidad celular; (3) disminuye el porcentaje de CSC y aumenta el porcentaje de no CSC; (4) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la división celular; o (5) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la división celular es un agente que disminuye selectivamente el porcentaje de CSC. Las propiedades de las CSC son como se han desvelado anteriormente.

- La etapa (i) de la presente realización se lleva a cabo preferentemente por análisis de citometría de flujo.
- La etapa (ii) de la presente realización se lleva a cabo preferentemente por un ensayo de viabilidad celular.
- 45 La etapa (iii) de la presente realización se lleva a cabo preferentemente por un ensayo de diferenciación celular.
- La etapa (iv) de la presente realización se lleva a cabo preferentemente por un ensayo de división celular.

50 **[0046]** En otro aspecto de esta realización, el agente candidato está seleccionado del grupo que consiste en un producto químico, un producto biológico, y combinaciones de los mismos.

[0047] En un aspecto adicional de esta realización, las CSC son resistentes a quimioterapia convencional.

55 **[0048]** Otra realización de la invención es un método de cribado de alto rendimiento para identificar agentes que disminuyen selectivamente el porcentaje de células madre de cáncer (CSC) en una población de células, en el que las CSC son resistentes a quimioterapia convencional. Este método comprende:

- a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato, en el que la CSC tiene las siguientes propiedades: HLA I y HLA II;
- 60 b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato:
- i. comparando, usando citometría de flujo, el porcentaje de CSC en la población de células, que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células, que no se trata con el agente candidato;
- 65 ii. determinando, usando un ensayo de viabilidad celular, el porcentaje de células viables en la población de células tratadas y no tratadas,

- iii. determinando, usando un ensayo de diferenciación celular, el porcentaje de células no CSC en la población de células tratadas y no tratadas; y
 iv. determinando, usando un ensayo de división celular, el porcentaje de células en división en la población de células tratadas y no tratadas,

5 en el que un agente candidato que (1) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la viabilidad celular; (2) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la viabilidad celular; (3) disminuye el porcentaje de CSC y aumenta el porcentaje de no CSC; (4) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la división celular; o (5) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la división celular es un agente que disminuye selectivamente el porcentaje de CSC. Las propiedades de la CSC pueden definirse adicionalmente, como se ha desvelado anteriormente.

15 **[0049]** En un aspecto de esta realización, el agente candidato está seleccionado del grupo que consiste en un producto químico, un producto biológico, y combinaciones de los mismos.

[0050] Otra realización de la presente invención es un agente para destruir selectivamente CSC identificadas por los métodos desvelados en el presente documento.

20 **[0051]** Otra realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el agente para destruir selectivamente las CSC identificadas anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 **[0052]** Sales farmacéuticamente aceptables, como se usa en el presente documento, son sales del agente para destruir selectivamente las CSC con ácidos minerales fisiológicamente compatibles, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso o ácido fosfórico; o con ácidos orgánicos, tales como ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido acético, ácido láctico, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido succínico o ácido salicílico. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a tales sales. Agentes en los que un grupo ácido está presente pueden formar adicionalmente sales con bases. Ejemplos de tales sales son sales alcalinas, alcalinotérricas y de amonio tales como, por ejemplo, sal de Na⁻, K⁻, Ca⁻ y de trimetilamonio. El término "sales farmacéuticamente aceptables" también se refiere a tales sales.

35 **[0053]** Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en cualquier manera deseada y eficaz: para ingestión oral, o como una pomada o gota para administración local a los ojos, o para administración parenteral u otra administración en cualquier manera apropiada tal como intraperitoneal, subcutánea, tópica, intradérmica, inhalación, intrapulmonar, rectal, vaginal, sublingual, intramuscular, intravenosa, intrarterial, intratecal o intralinfática. Además, una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse conjuntamente con otros tratamientos. Una composición farmacéutica de la presente invención puede encapsularse o protegerse de otro modo contra secreciones gástricas u otras, si se desea.

40 **[0054]** Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden uno o más principios activos, por ejemplo, uno o más agentes identificados por los métodos de la presente invención, en mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o varios de otros compuestos, fármacos, componentes y/o materiales. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los agentes/compuestos de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21^a Edición, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.).

50 **[0055]** Vehículos farmacéuticamente aceptables son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21^a Edición, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.) y The National Formulary (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.)) e incluyen azúcares (por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol), almidones, preparaciones de celulosa, fosfatos de calcio (por ejemplo, fosfato de dicalcio, fosfato de tricalcio e hidrogenofosfato de calcio), citrato de sodio, agua, soluciones acuosas (por ejemplo, solución salina, inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer con lactato), alcoholes (por ejemplo, alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol bencílico), polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), ésteres orgánicos (por ejemplo, oleato de etilo y triglicéridos), polímeros biodegradables (por ejemplo, polilactida-poliglicolida, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos)), matrices elastoméricas, liposomas, microesferas, aceites (por ejemplo, maíz, germen, oliva, ricino, sésamo, semilla de algodón y cacahuete), manteca de cacao, ceras (por ejemplo, ceras de supositorio), parafinas, siliconas, talco, silicilato, etc. Cada vehículo farmacéuticamente aceptable usado en una composición farmacéutica de la invención debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudicial para el sujeto. Vehículos adecuados para una forma de dosificación seleccionada y vía de administración prevista son muy conocidos en la técnica, y vehículos aceptables para una forma de dosificación elegida y método de administración pueden determinarse usando experiencia habitual en la técnica.

65 **[0056]** Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden, opcionalmente, contener componentes adicionales y/o materiales comúnmente usados en tales composiciones farmacéuticas. Estos componentes y

materiales son muy conocidos en la técnica e incluyen (1) cargas o sustancias de relleno, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y goma arábica; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, glicolato sódico de almidón, carboximetilcelulosa de sodio reticulada y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la disolución, tal como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos y laurilsulfato de sodio; (10) agentes de suspensión, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto; (11) agentes de tamponamiento; (12) excipientes, tales como lactosa, azúcares de la leche, polietilenglicoles, grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, manteca de cacao, almidones, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco, salicilato, óxido de cinc, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida; (13) diluyentes inertes, tales como agua o otros disolventes; (14) conservantes; (15) agentes tensioactivos; (16) agentes dispersantes; (17) agentes de liberación de control o que retrasan la absorción, tales como hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices de polímero, polímeros biodegradables, liposomas, microesferas, monoestearato de aluminio, gelatina y ceras; (18) opacificantes; (19) adyuvantes; (20) agentes humectantes; (21) agentes de emulsión y de suspensión; (22), agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano; (23) propulsores, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos sin sustituir volátiles, tales como butano y propano; (24) antioxidantes; (25) agentes que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto, tales como azúcares y cloruro sódico; (26) espesantes; (27) materiales de recubrimiento, tales como lecitina; y (28) agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Cada componente o material tal debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de formulación y no perjudiciales para el sujeto. Componentes y materiales adecuados para una forma de dosificación seleccionada y vía de administración prevista son muy conocidos en la técnica, y componentes y materiales aceptables para una forma de dosificación elegida y método de administración pueden determinarse usando experiencia habitual en la técnica.

[0057] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración por vía oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos, una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, un elixir o jarabe, una pastilla, un bolo, un electuario o una pasta. Estas formulaciones pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de recubrimiento en paila, mezcla, granulación o liofilización.

[0058] Pueden prepararse formas de dosificación sólidas para administración por vía oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos y similares), por ejemplo, mezclando el (los) principio(s) activo(s) con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, una o más cargas, sustancias de relleno, aglutinantes, humectantes, agentes disgregantes, agentes retardantes de la disolución, aceleradores de la absorción, agentes humectantes, absorbentes, lubricantes, y/o agentes colorantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando un excipiente adecuado. Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse usando un aglutinante adecuado, lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada. Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólida, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y vainas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También puede formularse de manera que se proporcione liberación lenta o controlada del principio activo en su interior. Pueden esterilizarse por, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias. Estas composiciones pueden también opcionalmente contener opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el principio activo solo, o preferencialmente, en una cierta porción del tubo gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada.

[0059] Formas de dosificación líquidas para administración por vía oral incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes adecuados comúnmente usados en la materia. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión.

[0060] Las composiciones farmacéuticas para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más principio(s) activo(s) con uno o más vehículos no irritantes adecuados que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura corporal y, por tanto, se fundirán

en el recto o cavidad vaginal y liberarán el compuesto activo. Composiciones farmacéuticas que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en spray que contienen tales vehículos farmacéuticamente aceptables como se sabe en la técnica que son apropiados.

5 **[0061]** Formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, sprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas e inhalantes. El (Los) agente(s) activo(s)/compuesto(s) puede(n) mezclarse bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener excipientes. Los polvos y sprays pueden contener excipientes y propulsores.

15 **[0062]** Composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más agente(s)/compuesto(s) en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso, que puede contener antioxidantes adecuados, tampones, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto, o agentes de suspensión o espesantes. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes adecuados, tales como

20 agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede desearse incluir agentes isotónicos. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción.

25 **[0063]** En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco (por ejemplo, formulación farmacéutica), se desea ralentizar su absorción de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede llevarse a cabo por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene mala solubilidad en agua.

30 **[0064]** La tasa de absorción del agente activo/fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de un agente/fármaco administrado por vía parenteral puede llevarse a cabo disolviendo o suspendiendo el agente activo/fármaco en un vehículo de aceite. Pueden prepararse formas de liberación prolongada inyectables formando matrices de microencapsulación del principio activo en polímeros biodegradables. Dependiendo de la relación del principio activo con el polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación de principio activo. También se preparan formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido del cuerpo. Los materiales inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

40 **[0065]** Las formulaciones pueden presentarse en envases sellados de dosis unitaria o multi-dosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

Definiciones adicionales

45 **[0066]** La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo y no pretende ser limitante. Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

50 **[0067]** Para la relación de intervalos numéricos en el presente documento, se contempla explícitamente cada número intermedio entremedias con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8, además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0 se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

55 Ácido nucleico

60 **[0068]** "Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido", usados en el presente documento, significan al menos dos nucleótidos ligados covalentemente juntos. La representación de una única hebra también define la secuencia de la hebra complementaria. Así, un ácido nucleico también engloba la hebra complementaria de una única hebra representada. Pueden usarse muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo fin que un ácido nucleico dado. Así, un ácido nucleico también engloba sustancialmente ácidos nucleicos idénticos y complementos de los mismos. Una única hebra proporciona una sonda que puede hibridarse con una secuencia diana bajo condiciones de hibridación rigurosas. Así, un ácido nucleico también engloba una sonda que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas.

65

- 5 **[0069]** Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener porciones de tanto secuencias bicatenarias como monocatenarias. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto ADN genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, en el que el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo- y ribo-nucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse como molécula monocatenaria o expresarse en una célula (*in vitro* o *in vivo*) usando un gen sintético. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.
- 10 **[0070]** El ácido nucleico también puede ser un ARN tal como un ARNm, ARNt, ARNhp, ARNip, ARN que interacciona con Piwi, miARNpri, miARNpre, miARN, o anti-miARN, como se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente de EE.UU. N.º 11/429.720, 11/384.049, 11/418.870 y 11/429.720 y las solicitudes internacionales publicadas N.º WO 2005/116250 y WO 2006/126040.
- 15 **[0071]** Puede llevarse a cabo el direccionamiento de genes de ARNip por transferencia de ARNip transitoria en células, logrado por métodos clásicos tales como transfección mediada por lípidos (tal como encapsulación en liposomas, complejación con lípidos catiónicos, colesterol y/o polímeros de condensación, electroporación o microinyección). El direccionamiento de genes de ARNip también puede llevarse a cabo por administración de ARNip conjugado con anticuerpos o ARNip complejado con una proteína de fusión que comprende un péptido que penetra en la célula conjugado con un dominio de unión de ARN bicatenario (bc) (DRBD) que se une al ARNip (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2009/0093026).
- 20 **[0072]** El ácido nucleico también puede ser un aptámero, un intrámero o un Spiegelmer. El término “aptámero” se refiere a una molécula de ácido nucleico o de oligonucleótido que se une a una diana molecular específica. Los aptámeros se derivan de un proceso evolutivo *in vitro* (por ejemplo, SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial), desvelado en la patente de EE.UU. N.º 5.270.163), que selecciona secuencias de aptámero específicas de diana de grandes bibliotecas combinatorias. Las composiciones de aptámeros pueden ser bicatenarias o monocatenarias, y pueden incluir desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, derivados de nucleótidos, u otras moléculas tipo nucleótido. Los componentes de nucleótido de un aptámero pueden tener grupos azúcar modificados (por ejemplo, el grupo 2'-OH de un ribonucleótido puede sustituirse por 2'-F o 2'-NH₂), que puede mejorar una propiedad deseada, por ejemplo, resistencia a nucleasas o mayor semivida en sangre. Los aptámeros pueden conjugarse con otras moléculas, por ejemplo, un vehículo de alto peso molecular para ralentizar la eliminación del aptámero del aparato circulatorio. Los aptámeros pueden reticularse específicamente con sus ligandos relacionados, por ejemplo, por fotoactivación de un reticulante (Brody, E. N. y L. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13).
- 25 **[0073]** El término “intrámero” se refiere a un aptámero que se expresa *in vivo*. Por ejemplo, se ha usado un sistema de expresión en ARN basado en el virus de la variolovacuna para expresar aptámeros de ARN específicos a altos niveles en el citoplasma de leucocitos (Blind, M. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3606-3610).
- 30 **[0074]** El término “Spiegelmer” se refiere a un aptámero que incluye L-ADN, L-ARN, u otros derivados de nucleótidos del lado izquierdo o moléculas similares a nucleótido. Los aptámeros que contienen nucleótidos del lado izquierdo son resistentes a la degradación por enzimas que existen de forma natural, que normalmente actúan sobre sustratos que contienen nucleótidos del lado derecho.
- 35 **[0075]** Un ácido nucleico generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque pueden incluirse análogos de ácido nucleico que pueden tener al menos un enlace diferente, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforditioato u O-metilfosforoamidito, y esqueletos y enlaces peptídicos de ácido nucleico. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con esqueletos positivos; esqueletos no iónicos, y esqueletos no de ribosa, que incluyen los desvelados en las patentes de EE.UU. N.º 5.235.033 y 5.034.506. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más nucleótidos que no existen de forma natural o modificados también están incluidos dentro de la definición de ácido nucleico. El análogo de nucleótidos modificado puede localizarse, por ejemplo, en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico. Ejemplos representativos de análogos de nucleótidos pueden seleccionarse de ribonucleótidos modificados con azúcar o en el esqueleto. Debe observarse, sin embargo, que también son adecuados ribonucleótidos modificados con nucleobase, es decir, ribonucleótidos, que contienen una nucleobase que no existe de forma natural en lugar de una nucleobase que existe de forma natural tal como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino)propiluridina, 5-bromouridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo, 8-bromoguanosina; deaza-nucleótidos, por ejemplo, 7-deaza-adenosina; nucleótidos O- y N-alquilados, por ejemplo, N6-metiladenosina. El grupo 2'-OH puede sustituirse con un grupo seleccionado de H, OR, R, halógeno, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en el que R es alquilo C₁-C₆, alqueniilo o alquinilo y halógeno es F, Cl, Br o I. Los nucleótidos modificados también incluyen nucleótidos conjugados con colesterol mediante, por ejemplo, un enlace hidroxiprolinol como se desvela en Krutzfeldt et al., Nature (30 de Oct. de 2005), Soutschek et al., Nature 432:173-178 (2004), y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20050107325. Los nucleótidos y ácidos nucleicos modificados también pueden incluir ácidos nucleicos bloqueados (LNA), como se desvela en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20020115080. Nucleótidos y ácidos nucleicos modificados adicionales se desvelan en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20050182005. Pueden hacerse modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato por una variedad de motivos, por
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ejemplo, para aumentar la estabilidad y semivida de tales moléculas en entornos fisiológicos, para potenciar la difusión a través de membranas celulares, o como sondas sobre un biochip. Pueden prepararse mezclas de ácidos nucleicos y análogos que existen de forma natural; alternativamente, pueden prepararse mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos que existen de forma natural y análogos.

5

Péptido, polipéptido, proteína

[0076] Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento. En la presente invención, estos términos significan una secuencia de aminoácidos ligada, que puede ser natural, sintética, o una modificación, o combinación de natural y sintética. El término incluye anticuerpos, miméticos de anticuerpos, anticuerpos de dominio, lipocalinas, proteasas dirigidas y miméticos de polipéptido. El término también incluye vacunas que contienen un péptido o fragmento de péptido previsto para producir anticuerpos contra el péptido o fragmento de péptido.

10

[0077] “Anticuerpo”, como se usa en el presente documento, incluye un anticuerpo de las clases IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, o fragmentos o derivados de los mismos, que incluyen Fab, F(ab')₂, Fd, y anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos bifuncionales. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo purificado por afinidad, o mezclas de los mismos que presentan especificidad de unión suficiente por un epítipo deseado o una secuencia derivada del mismo. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede derivatizarse por la unión de uno o más restos químicos, de péptido o de polipéptido conocidos en la técnica. El anticuerpo puede conjugarse con un resto químico. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o humanizado. Estos y otros anticuerpos se desvelan en la solicitud de patente publicada de EE.UU. N.º 20070065447.

15

20

[0078] También están dentro del alcance de la presente invención otras moléculas similares a anticuerpos. Tales moléculas similares a anticuerpos incluyen, por ejemplo, trampas de receptores (tales como entanercept), miméticos de anticuerpos (tales como adnectinas, moléculas de unión terapéuticas “direccionables” basadas en fibronectina de, por ejemplo, Compounds Therapeutics, Inc.), anticuerpos de dominio (el fragmento funcional más pequeño de un anticuerpo de un solo dominio que existe de forma natural (tal como, por ejemplo, nanocuerpos; véase, por ejemplo, Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 2004 Apr 15;64(8):2853-7)).

25

30

[0079] Generalmente pueden usarse miméticos de anticuerpos adecuados como sustitutos para los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento. Tales miméticos de anticuerpos pueden asociarse a propiedades ventajosas (por ejemplo, pueden ser solubles en agua, resistentes a la proteólisis, y/o ser no inmunogénicos). Por ejemplo, se han propuesto y generado péptidos que comprenden una estructura de bucle beta sintético que imita la segunda región determinante de la complementariedad (CDR) de anticuerpos monoclonales. Véase, por ejemplo, Saragovi et al., Science. Aug. 16, 1991;253(5021):792-5. También se han generado miméticos de anticuerpos de péptido por uso de mapeo de péptidos para determinar el reconocimiento “activo” de residuos de antígeno, modelado molecular, y un análisis de la trayectoria por Molecular Dynamics, para diseñar un mimético de péptido que contiene residuos de contacto de antígeno de múltiples CDR. Véase, por ejemplo, Cassett et al., Biochem Biophys Res Commun. Jul. 18, 2003;307(1):198-205. Discusión adicional de principios relacionados, métodos, etc., que pueden aplicarse en el contexto de la presente invención se proporciona en, por ejemplo, Fassina, Immunomethods. Octubre 1994;5(2):121-9.

35

40

[0080] Como se usa en el presente documento, “péptido” incluye proteasas dirigidas, que son capaces de, por ejemplo, inhibición dirigida a sustrato de la modificación postraduccional tal como se desvela en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20060275823.

45

[0081] En la presente invención, “péptido” incluye adicionalmente anticalinas. Las anticalinas pueden cribarse para agentes que disminuyen el número de células madre de cáncer. Las anticalinas son proteínas de unión a ligando que se han construido basándose en un andamiaje de lipocalina (Weiss, G. A. y H. B. Lowman (2000) Chem. Biol. 7:R177-R184; Skerra, A. (2001) J. Biotechnol. 74:257-275). La arquitectura de la proteína de lipocalinas puede incluir un barril beta que tiene ocho hebras beta antiparalelas, que soporta cuatro bucles en su extremo abierto. Estos bucles forman el sitio de unión a ligando natural de las lipocalinas, un sitio que puede volver a manipularse *in vitro* por sustituciones de aminoácidos para conferir especificidades de unión novedosas. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse usando métodos conocidos en la técnica, y pueden incluir sustituciones conservativas (por ejemplo, sustituciones que no alteran la especificidad de unión) o sustituciones que alteran modestamente, moderadamente o significativamente la especificidad de unión.

50

55

[0082] En general, un mimético de polipéptido (“peptidomimético”) es una molécula que imita la actividad biológica de un polipéptido, pero que no es de naturaleza química peptídica. Aunque, en ciertas realizaciones, un peptidomimético es una molécula que no contiene enlaces peptídicos (es decir, enlaces amida entre aminoácidos), el término peptidomimético puede incluir moléculas que no son de carácter completamente peptídico, tales como pseudopéptidos, semi-péptidos y peptoides. A continuación se describen ejemplos de algunos peptidomiméticos por la definición más amplia (por ejemplo, en la que parte de un polipéptido está sustituida con una estructura que carece de enlaces peptídicos). Si es de carácter completamente o parcialmente no peptídico, los peptidomiméticos

60

65

según la presente invención pueden proporcionar una disposición espacial de restos químicos reactivos que se parece mucho a la disposición tridimensional de grupos activos en un polipéptido. Como resultado de esta geometría de sitio activo similar, el peptidomimético puede presentar efectos biológicos que son similares a la actividad biológica de un polipéptido.

5 [0083] Hay varias posibles ventajas de usar un mimético de un polipéptido dado en vez del propio polipéptido. Por ejemplo, los polipéptidos pueden presentar dos atributos no deseables, es decir, mala biodisponibilidad y corta duración de la acción. Los peptidomiméticos son frecuentemente suficientemente pequeños para ser tanto activos por vía oral como para tener una larga duración de la acción. También hay problemas asociados a la estabilidad, almacenamiento e inmunorreactividad de los polipéptidos que pueden reducirse con peptidomiméticos.

10 [0084] Los polipéptidos que tienen una actividad biológica deseada pueden usarse en el desarrollo de peptidomiméticos con actividades biológicas similares. Se conocen técnicas de desarrollo de peptidomiméticos a partir de polipéptidos. Los enlaces peptídicos pueden sustituirse por enlaces no peptídicos que permiten al peptidomimético adoptar una estructura similar, y por tanto actividad biológica, al polipéptido original. También pueden hacerse modificaciones adicionales reemplazando grupos químicos de los aminoácidos con otros grupos químicos de estructura, forma o reactividad similar. El desarrollo de peptidomiméticos puede ayudarse determinando la estructura terciaria del polipéptido original, tanto libre como unido a un ligando, por espectroscopía de RMN, cristalografía y/o modelado molecular ayudado por ordenador. Estas técnicas ayudan en el desarrollo de composiciones novedosas de mayor potencia y/o mayor biodisponibilidad y/o mayor estabilidad que el polipéptido original (Dean (1994), *BioEssays*, 16: 683-687; Cohen y Shatzmiller (1993), *J. Mol. Graph.*, 11: 166-173; Wiley y Rich (1993), *Med. Res. Rev.*, 13: 327-384; Moore (1994), *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 124-129; Hruby (1993), *Biopolymers*, 33: 1073-1082; Bugg et al. (1993), *Sci. Am.*, 269: 92-98).

25 Polisacáridos

[0085] El término "polisacáridos" significa estructuras de hidrato de carbono poliméricas, formadas de unidades de repetición (tanto mono- como di-sacáridos) unidas juntas por enlaces glucosídicos. Las unidades de mono- o di-sacáridos pueden ser iguales o diferentes. Ejemplos no limitantes de polisacáridos incluyen almidón, glucógeno, celulosa y quitina.

Moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas

35 [0086] La expresión molécula "orgánica pequeña" o "inorgánica pequeña" incluye cualquier resto químico u otro resto distinto de polisacáridos, polipéptidos y ácidos nucleicos, que puede actuar para afectar los procesos biológicos. Las moléculas pequeñas pueden incluir cualquier número de agentes terapéuticos presentemente conocidos y usados, o pueden sintetizarse en una biblioteca de tales moléculas con el fin de cribar la función (funciones) biológica(s). Las moléculas pequeñas se distinguen de las macromoléculas por el tamaño. Las moléculas pequeñas de la presente invención normalmente tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 daltons (Da), preferentemente inferior a aproximadamente 2,500 Da, más preferentemente inferior a 1.000 Da, lo más preferentemente inferior a aproximadamente 500 Da.

45 [0087] Como se usa en el presente documento, el término "compuesto orgánico" se refiere a cualquier compuesto basado en carbono distinto de macromoléculas tales como ácidos nucleicos y polipéptidos. Además del carbono, los compuestos orgánicos pueden contener calcio, cloro, flúor, cobre, hidrógeno, hierro, potasio, nitrógeno, oxígeno, azufre y otros elementos. Un compuesto orgánico puede estar en una forma aromática o alifática. Ejemplos no limitantes de compuestos orgánicos incluyen acetonas, alcoholes, anilinas, hidratos de carbono, mono-sacáridos, di-sacáridos, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, lípidos, retinoides, esteroides, proteoglicanos, cetonas, aldehídos, grasas, aceites y ceras saturadas, insaturadas y poliinsaturadas, alquenos, ésteres, éteres, tioles, sulfuros, compuestos cíclicos, compuestos heterocíclicos, imidazoles y fenoles. Un compuesto orgánico como se usa en el presente documento también incluye compuestos orgánicos nitrados y compuestos orgánicos halogenados (por ejemplo, clorados). Las colecciones de moléculas pequeñas, y moléculas pequeñas identificadas según la invención, se caracterizan por técnicas tales como espectrometría de masas con aceleradores (AMS; véase Turteltaub et al., *Curr Pharm Des* 2000 6:991-1007, *Bioanalytical applications of accelerator mass spectrometry for pharmaceutical research*; y Enjalbal et al., *Mass Spectrom Rev* 2000 19:139-61, *Mass spectrometry in combinatorial chemistry*).

50 [0088] Las moléculas pequeñas preferidas son relativamente más fáciles y menos caras de fabricar, formular o de preparar de otro modo. Las moléculas pequeñas preferidas son estables bajo una variedad de condiciones de almacenamiento. Las moléculas pequeñas preferidas pueden disponerse en estrecha asociación con macromoléculas para formar moléculas que son biológicamente activas y que tienen propiedades farmacéuticas mejoradas. Las propiedades farmacéuticas mejoradas incluyen cambios en el tiempo de circulación, distribución, metabolismo, modificación, excreción, secreción, eliminación y estabilidad que son favorables para la actividad biológica deseada. Las propiedades farmacéuticas mejoradas incluyen cambios en las características toxicológicas y de eficacia de la entidad química.

65

[0089] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente los métodos y composiciones de la presente invención. Estos ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden limitar el alcance de la invención de ningún modo.

5 **EJEMPLO 1**

CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTES A DOCETAXEL MUESTRAN UN DISTINTIVO MOLECULAR EN DESARROLLO DE ACUERDO CON LA ESTAMINALIDAD CELULAR.

10 [0090] El docetaxel es un agente antimitótico actualmente usado como terapia convencional en pacientes con cáncer de próstata resistente a hormonas (Petrlak *et al.*, 2004; Tannock *et al.*, 2004). Sin embargo, todos los pacientes experimentan por último lugar la progresión de la enfermedad, y ningún otro tratamiento controla la enfermedad en este contexto. Debido a la relevancia clínica de este fenómeno de resistencia, se generó un modelo *in vitro* de resistencia a docetaxel usando las líneas celulares independientes de hormonas de cáncer de próstata bien establecidas DU145 y 22RV1 para caracterizar las alteraciones moleculares responsables de un evento tal. (Figuras 1a-d).

20 [0091] Se expusieron células DU145 y 22RV1 a dosis crecientes de docetaxel, y la quimiorresistencia adquirida se caracterizó y confirmó por ensayos de viabilidad celular, formación de colonias, anexina V y escisión de poli-(ADP-ribosa)polimerasa (PARP). (Figuras 1a-d). Las células resistentes a docetaxel (DR) generadas mostraron resistencia cruzada a fármacos que dañan el ADN (mitoxantrona, doxorubicina y cisplatino), además de a otros agentes antimitóticos (vinorelbina y paclitaxel), de acuerdo con un fenotipo resistente a multi-fármaco (datos no mostrados).

25 [0092] Se realizó la pauta de expresión génica, usando micromatrices de oligonucleótidos, para comparar células de cáncer de próstata sensibles (DU145 y 22RV1 - células parentales) y con resistencia adquirida (DU145-DR y 22RV1-DR). Se seleccionaron genes con aumento o disminución de al menos 2 veces en la expresión de transcritos para el análisis adicional. Este análisis desveló 1245 y 990 genes desregulados en células DU145-DR y 22RV1-DR, respectivamente, de los que 247 genes se solaparon (Figura 2a izquierda). De estos genes de solapamiento, el 29,5 % se regularon por incremento y el 70,5 % se regularon por disminución. Sorprendentemente, la evaluación de la categoría de ontología génica de procesos biológicos de los 247 transcritos comúnmente desregulados revelaron que, además del enriquecimiento esperado para la proliferación celular, la muerte celular y los procesos biológicos de respuesta a fármaco, las categorías de desarrollo y de inmunovigilancia se representaron significativamente (Figura 2a derecha). Los genes de relevancia en la biología del cáncer de próstata y la estaminalidad que se encontraron regulados por aumento o por disminución incluyeron: a) biomarcadores de diferenciación epitelial - citoqueratinas (CK18 y 19), y marcadores específicos de la próstata tales como receptor de andrógenos (AR), antígeno específico de la próstata (PSA) y antígeno prostático específico de membrana (PSMA); b) antígenos de inmunovigilancia - clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (clase I del MHC); y c) vías de señalización de estaminalidad - Wnt/ β -catenina, Notch y Hedgehog. Los genes seleccionados de relevancia se muestran en las Tablas 1 y 2 a continuación. Los niveles de transcritos de ciertos genes citoestructurales y vías de señalización, además de las características clínico-patológicas y fenotípicas de 20 muestras de tejido de pacientes con cáncer de próstata metastásico, se resumen en la Tabla 3 a continuación.

TABLA 1

	Regulado por disminución/ inactivo	Regulado por incremento/ activo
Resistencia a fármaco		MDRI (Pgp) MRPI MRP2 MRP3 ABC3
Marcadores CK18 de diferenciación epitelial	CK8 CK19 ELF3 (factor de transcripción del dominio ets) EMPI (proteína 1 de la membrana epitelial)	
Marcadores de diferenciación mesenquimatosa	Vimentina α -Actina de músculo liso MCAM (CD146)	

	Regulado por disminución/ inactivo	Regulado por incremento/ activo
Moléculas de adhesión a fibronectina	ADAM8 ADAMTS1 AGRN (agrina) ALCAM (CD166) AMIG02 CLDN1 (claudina 1) CLDN4 (claudina 4) CLDN7 (claudina 7) CLDN10 (claudina 10) CLDN11 (claudina 11) CDH1 (e-cadherina) CDH2 (n-cadherina) CDH3 (p-cadherina) CDH7 (cadherina 7) CDCP1 (proteína 1 que contiene el dominio CUB) ICAM1 ITGA3 (integrina alfa 3) ITGA5 (integrina alfa 5) ITGA6 (integrina alfa 6) JUP (placoglobina de unión) LAMA3 (laminina alfa 3) LAMB3 (laminina beta 3) LAMC2 (laminina C 2) SDC1 (sindecano 1) SDC2 (sindecano 2) ZYX (zixinano)	
Desarrollo	AXIN1 (regulador negativo WNT) DKK1 (regulador negativo WNT) WIFI (regulador negativo WNT) GPRC5A GPRC5C	ABLIM3 NOTCH2 HES1 HEY1 PTCH1 GLI1 GLI2 BMP1 (proteína 1 morfogénica ósea) GATA2 NES (nestina) NKX3.1
Inmunovigilancia	HLA-A HLA-B HLA-C HLA-E HLA-F HLA-G HLA-DR HLA-DQ HLA-DP CD59 CD74 MR1 (clase I del complejo mayor de histocompatibilidad) SECTM1	
Marcadores de diferenciación de agrupamientos	CD133 CD24 CD63	

ES 2 586 599 T3

	Regulado por disminución/ inactivo	Regulado por incremento/ activo
Transducción de señales	AKAP1 (PKA y PKC) AKAP12 (PKA y PKC) ANXA3 (fosfato de inositol) CALM1 (calmodulina) CDS2 (fosfatidil inositol) EFNB2 (efrina-B2) EGFR EHD1 (sustrato de EGFR) ETS1 ETS2 FOSL1 HGF (factor de crecimiento hepático) HSP90 (proteína de choque térmico 90) HSP70 (proteína de choque térmico 70) IFI16 (proteína inducible por interferón gamma) IFI35 (proteína inducible por interferón gamma) IFITM1 (proteína transmembranaria inducible por IF) IFITM2 (proteína transmembranaria inducible por IF) IFITM3 (proteína transmembranaria inducible por IF) IFNAR1 (receptor 1 de interferón) IFNAR2 (receptor 2 de interferón) IL6 (interleucina 6) IL6R (receptor de interleucina 6) IL8 (interleucina 8) LIMK1 (quinasa 1 de dominio LIM) MET (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos) NMB (neuromedina) STAT3	ARHGEF10 (RhoPTTasa) MZF1
Ciclo celular	AURKA (aurora quinasa A) G0S2 (gen de conexión G0G1) KTN1 (receptor 1 de kinesina, MAP)	MCM5 NSL1 (componente cinetocoro) RMND5A
Angiogénesis	OS9 VEGFA VEGFB VEGFC	BAI2 (inhibidor de la angiogénesis) BAI3 (inhibidor de la angiogénesis) BAIAP2 (inhibidor de la angiogénesis)
Metabolismo	ALDH2 ARSJ (sulfatasa) B4GALT1 (galactosa) GALC (galactosilceramida)	AKR1C1 AKR1C2 AKR1C3 ALDH3A2 ALDH3B1 GCLC (glutamatocisteinligasa)
Estrés oxidativo		OGGI OSGIN1 OSGIN2
Otros	ADCK2 (quinasa 2 de dominio aarf) APP (proteína precursora de amiloide B) BACE2 (enzima escisora del precursor de amiloide B) CARS (cisteinil-ARNt sintetasa) CREG1 (inhibidor de EIA) GSN (gelsolina, amiloide)	Homeocaja 2 de ADNP

TABLA 2

Nombre del gen	Cambio de x veces de DU145/DR; 22RV1/DR	Valor de p (prueba de la t)
Queratina 19	-29,8;-21,5	<0,0001; <0,0001
Queratina 18	-2,7;-2,1	<0,05; <0,05
Receptor de andrógenos	NE;-2,2	-; <0,05
Folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de la próstata) 1	NE;-5,4	-; <0,0001
Peptidasa 3 relacionada con calicreína	NE;-4,3	-; <0,0001
Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, A	-2,1;-5,4	<0,05; <0,0001
Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, B	-2,0;-3,9	<0,05; <0,05
Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, C	-2,3;-4,4	<0,05; <0,0001
Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, E	-2,1;-2,6	<0,05; <0,05
Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, F	-2,4;-1,8	<0,05; <NS
Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, G	-2,1;-1,7	<0,05; <NS
Homólogo 1 de Dickkopf (Xenopus laevis)	-3,8;-3,2	<0,05; <0,05
Homólogo 2 de Notch (Drosophila)	+4,2;+2,1	<0,0001; <0,05
Homólogo 1 de Patched (Drosophila)	+3,2;+3,3	<0,05; <0,05
Dedo de cinc 1 de la familia GLI	+2,2;+2,3	<0,05; <0,05
Dedo de cinc 2 de la familia GLI	+2,1;+2,0	<0,05; <0,05

Nota: NE= No expresado. NS=No significativo.

[0093] Genes que se encontraron regulados por incremento o por disminución en células resistentes a docetaxel (DU145-DR y 22RV1-DR) cuando se compararon con sus células parentales sensibles (DU145 y 22RV1) se resumen en la Tabla 2. Se hizo el análisis estadístico de la diferencia promedio de la expresión media de genes, que muestra ≥ 2 veces de cambio basándose en una normalización logarítmica, usando una prueba de la t entre células sensibles y resistentes emparejadas. Hubo una disminución en los niveles de transcripción de genes implicados en la diferenciación epitelial, marcadores específicos de la próstata y marcadores de inmuno-vigilancia. Por otra parte, se regularon por incremento los transcritos de genes de factores de transcripción en desarrollo.

TABLA 3

Paciente	Sitio metastásico	Estado hormonal	CK18+19	% de β - catenina activa	% de NOTCH-2 escindido	% de Gli-1	% de Gli-2
1	Peritoneo	Independiente	-	66,6	77,7	87	92
			+	2	4	1,3	2
2	Hueso	Independiente	-	33,3	33,3	73	77
			+	0	0	0,5	0,5
3	Cerebro	Dependiente	-		94	60	65
			+	4,5	36	1,2	2,1
4	Pulmón	Independiente	-	75	93	78	75
			+	2	3,5	1,2	1
5	Hueso		-	66	75	67	67
			+	3	0	05	05
6	Epidural	Independiente	-	75	77,7	58	66
			+	0,8	201	0,9	0,3
7	Ganglio linfático	Independiente	-	30	81,8	36	38
			+	0,1	10,4	0	0
8	Hueso	Independiente	-	75	52	71	75
			+	4	0	1,8	2,1
9	Ganglio linfático	Independiente	-	80	2,3	65	72
			+	2,2	2,3	2,1	2,1
10	Ganglio linfático	Independiente	-	30	37	55	63
			+	0	0	0,9	0,8
11	Testicular	Independiente	-	30	87	48	56
			+	0,1	5,3	1,2	1,5
12	Ganglio linfático	Independiente	-	40	68	33,3	33,3
			+	0,3	1,5	0	0
13	Ganglio linfático	Independiente	-	66	54	68	65
			+	0,1	4,5	1,4	1,5
14	Ganglio linfático	Dependiente	-	75	100	63	75
			+	0,1	48	1,8	1,5
15	Ganglio linfático	Dependiente	-	50	76	33,3	33,3
			+	0,3	1,3	0	0

Paciente	Sitio metastásico	Estado hormonal	CK18+19	% de β -catenina activa	% de NOTCH-2 escindido	% de Gli-1	% de Gli-2
16	Ganglio linfático	Independiente	-		32	97	97
			+	40	0	33	47
17	Ganglio linfático	Dependiente	-	40	40	55	66
			+	1	0	1,5	2
18	Hueso	Independiente	-	87	83	83	86
			+	9,7	4	18	15
19	Ganglio linfático	Dependiente	-	90	86	79	83
			+	40	17	2,3	2,5
20	Ganglio linfático	Independiente	-	88	94	71	67
			+	7	35	1,2	0,9

[0094] La validación de proteína de estos genes por transferencia Western (Figura 2c) y ensayos de inmunofluorescencia (Figuras 2d y 2f) confirmó que las células con resistencia adquirida tenían una disminución en las proteínas de diferenciación epitelial, biomarcadores específicos de la próstata y antígenos de inmuno-vigilancia, y presentaron una activación (expresión nuclear) de vías de señalización en desarrollo (Figura 2d). La β -catenina activada, Gli1, Gli2 y NOTCH-2 escindido mostraron aumento significativo en la expresión de proteínas, además de inmunolocalización nuclear, cuando se comparan células resistentes a docetaxel con células parentales sensibles, que presentaron principalmente una expresión citoplásmica/membranosa. Además, se encontró que este fenotipo se asociaba al fenómeno quimiorresistente, ya que las células con resistencia adquirida invertida se recuperan del fenotipo diferenciado (Figura 13).

[0095] Con respecto a estudios de diferenciación, se evaluaron la expresión de citoqueratinas (CK) como marcadores epiteliales, además de biomarcadores relacionados con la próstata, que incluyen AR, PSA y PSMA. Se ha informado previamente que las CK son específicas para células epiteliales diferenciadas humanas, que desempeñan una función en el mantenimiento de la integridad celular, mientras que también funcionan en la transducción de señales y los procesos de diferenciación celular (Brulet *et al.*, 1980; Lu *et al.*, 1980; Oshima *et al.*, 1981; Tesar *et al.*, 2007). Las CK de bajo peso molecular (por ejemplo, CK18 y CK19) se expresan específicamente en células de próstata humana normal luminales y cáncer de próstata, mientras que las CK de alto peso molecular (por ejemplo, CK5 y CK10) se identifican en células de próstata normal basales y se observan raramente en poblaciones de células cancerosas (Ali *et al.*, 2008). Las células resistentes a docetaxel mostraron una disminución significativa en tanto la transcripción génica como la expresión de proteínas de CK de bajo peso molecular. Las células DU145-DR mostraron una disminución de 6,25 y 16,6 veces en la expresión de proteínas de CK 19 y 18, respectivamente. Similarmente, 22RV1-DR mostraron una disminución de 14,3 y 6,7 veces en tales CK cuando se cuantifican y se comparan con las células parentales sensibles. La tinción por inmunofluorescencia de CK19 y CK18 confirmó su expresión reducida en las células resistentes a docetaxel (Figura 2). Además, las CK de alto peso molecular continuaron siendo indetectables en las células resistentes a docetaxel como en sus células parentales correspondientes (datos no mostrados), que indica que en el proceso de adquirir resistencia a docetaxel, las células pierden marcadores de diferenciación epitelial y no experimentan un desplazamiento de un fenotipo luminal (CK de bajo peso molecular) a uno tipo basal (CK de alto peso molecular). Además, células 22RV1, que expresan marcadores de diferenciación relacionados con la próstata que incluyen AR, PSMA y PSA, mostraron una espectacular disminución de los niveles de expresión génica y de proteínas de tales marcadores cuando se exponen a docetaxel (Figura 2). Las células 22RV1-DR mostraron una disminución de 16,6, 20,0 y 11,1 veces en la expresión de proteínas de AR, PSMA y PSA, respectivamente. Estos resultados se confirmaron adicionalmente por análisis de inmunofluorescencia (datos no mostrados).

[0096] Con respecto a los mecanismos de inmuno-evasión, se encontró que las células resistentes a docetaxel mostraron desregulación de moléculas de la clase I del MHC. Se observó que los antígenos de la clase I del MHC, que son críticos para la eficaz presentación de antígenos a linfocitos T citotóxicos y la posterior lisis de células tumorales, se regularon por disminución a tanto el nivel de transcripción génica como de proteína (Figura 2). La pauta de expresión génica reveló una regulación por disminución significativa en todos los antígenos de la clase I del MHC (A, B, C, E, F, G), un hecho que se confirmó al nivel de proteína por inmunotransferencia y tinción por inmunofluorescencia de los antígenos de la clase I del MHC A, B, C (Figura 2). Así, estas células presentan un fenotipo que favorece la inmuno-evasión, haciéndolas indetectables por el sistema inmunitario del huésped.

[0097] Con respecto a los estudios sobre el fenotipo de células madre, se caracterizó la expresión desregulada identificada de WNT/ β -catenina, Notch y Hedgehog. Estas vías participan en la autorrenovación y diferenciación de células progenitoras (Kato *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2006; van den Brink *et al.*, 2004; Radtke *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2008; y Grigoryan *et al.*, 2008). En la próstata, estas vías de señalización desempeñan funciones esenciales en la pauta de desarrollo, la regeneración epitelial y la tumorigénesis del cáncer de próstata (Wang *et al.*, 2006; Karhadkar *et al.*, 2004). Las células resistentes a docetaxel mostraron una disminución significativa en tanto los niveles de transcrito de genes como de proteína del inhibidor de WNT Dickkopf-1 (DKK1), un inhibidor muy conocido de la red de señalización de WNT/ β -catenina (Fedi *et al.*, 1999). Esta disminución en la expresión de DKK1 se

asoció a un aumento en la expresión de β -catenina desfosforilada (activa), que es el principal efector clave de la señalización de WNT. El análisis de inmunofluorescencia demostró que las células sensibles a docetaxel parentales presentaron una expresión membranosa de β -catenina, asociada a su función como molécula de adhesión, mientras que las células resistentes a docetaxel mostraron una pronunciada localización nuclear de esta proteína (Figura 2), informada como necesaria para la activación de la vía de señalización canónica de WNT (Willert *et al.*, 2006). Además, las células resistentes a docetaxel también presentaron un aumento en la red de señalización de NOTCH. Los niveles de transcrito de genes NOTCH2 aumentaron significativamente en las células resistentes y se asociaron a un aumento en la expresión de proteínas Notch2 escindidas que se asoció a translocalización nuclear de la proteína, donde ejerce su actividad transcripcional (Figura 2). Finalmente, las células resistentes a docetaxel tuvieron una elevada expresión del receptor Hedgehog Patched y los factores de transcripción de homólogo de oncogén asociado a glioma, Gli1 y Gli2. Estos hallazgos se asociaron a un aumento de la expresión de proteínas y translocalización nuclear de los factores de transcripción anteriormente mencionados (Figura 2), una condición que se ha relacionado con la activación de la vía de Hedgehog. Sorprendentemente, no se encontró que otros marcadores superficiales de células madre informados, tales como CD44 y CD133, se regularan por incremento en este estudio, como se analiza tanto a los niveles de transcrito de gen como de proteína (datos no mostrados).

[0098] Basándose en el hecho de que las células resistentes a docetaxel presentaron un fenotipo de acuerdo con la estaminalidad, se probó si estas células presentaron una mayor capacidad de iniciación tumoral que las células parentales. La inyección subcutánea en ratones NOD/SCID de 10^2 y 10^3 células resistentes a docetaxel (22RV1-DR y DU145-DR) dio lugar a significativamente más tumores que sus células parentales sensibles (Figura 2e). La inyección de 10^2 células DU145-DR y 22RV1-DR indujo la formación tumoral en el $83,3 \pm 7,8\%$ y el $79,0 \pm 10,4\%$ de los receptores, respectivamente; mientras que la inyección de células parentales DU145 y 22RV1 indujo la formación tumoral en solo el $38,8 \pm 15,2\%$ y el $46,0 \pm 9,3\%$, respectivamente ($p < 0,0001$). Además, aunque no hubo diferencia en la formación tumoral cuando se inyectaron 10^4 células parentales y resistentes, la latencia tumoral fue significativamente más corta para las células resistentes. La latencia tumoral para las células parentales DU145 fue $59,2 \pm 4,9$ días frente a $43,2 \pm 2,6$ días para las células resistentes ($p < 0,0001$). Similarmente, la latencia tumoral fue significativamente ($p < 0,0001$) más larga para las células 22RV1 ($54,9 \pm 1,5$ días) en comparación con las células resistentes ($35,3 \pm 1,9$ días). Así, el distintivo molecular de estaminalidad de células resistentes a docetaxel se reforzó funcionalmente por su alta capacidad de iniciación tumoral.

EJEMPLO 2

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE PRÓSTATA

[0099] Considerando el distintivo de estaminalidad y la mayor capacidad de iniciación tumoral de las células resistentes a docetaxel generadas, se investigó si el fenómeno de quimiorresistencia era debido o no a una transición de células sensibles a resistentes con características de estaminalidad, o alternativamente si la quimioterapia seleccionaría células madre de cáncer de próstata pre-existentes (Figura 3c). Debido a que las células DU145 y 22RV1 resistentes a docetaxel comúnmente presentaron regulación por disminución de CK19 y CK18, y antígenos de la clase I del MHC, se determinó si las células con un fenotipo CK-negativo/clase I de HLA-negativo estaban ya presentes o no en las líneas parentales. La tinción por inmunofluorescencia reveló la presencia de una pequeña subpoblación de CK-negativo/clase I de HLA-negativo en ambas líneas celulares, que representó un $2,19 \pm 0,95\%$ y $3,58 \pm 0,79\%$ de la población total de células DU145 y 22RV1 parentales, respectivamente, cuando se cuantificaron por citometría de flujo (Figura 4b).

[0100] Entonces se estudió si las células tumorales CK-negativo/clase I de HLA-negativo identificadas podrían sobrevivir a la exposición a docetaxel, siendo así responsables del fenómeno de quimiorresistencia adquirida. Para este fin, las células DU145 parentales se transfectaron establemente con un plásmido que contenía un promotor de CK19 que conduce la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) (Figuras 14a y 14b). Las células DU145 parentales se transfectaron establemente con un plásmido que contenía un promotor de CK19 que conduce la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 6a). La co-expresión de CK19 y GFP se confirmó por citometría de flujo e inmunofluorescencia (Figura 6b). Las células que expresaron CK19 fueron GFP positivo (GFP+), mientras que las células que no expresaron CK19 fueron GFP negativo (GFP-). Además, se confirmó la inserción estable de una construcción de promotor en células CK19/GFP negativo por PCR (Figura 6C). Además, se demostró que estas células CK19/GFP negativo fueron HLA negativo tanto por citometría de flujo como inmunofluorescencia (Figuras 6d).

[0101] Se sembraron células estables DU145-promotor de CK19-GFP no clasificadas y se expusieron a docetaxel (10 nM) y se realizó la obtención de imágenes in vivo durante periodos de hasta 48 horas. Las películas resultantes mostraron que la exposición a docetaxel seleccionó células con el fenotipo GFP-negativo que fueron capaces de dividirse y salir de la mitosis con terapia, mientras que las células GFP-positivo murieron después de la parada mitótica (Figura 5b). El análisis de citometría de flujo reveló que el tratamiento con docetaxel produjo un desplazamiento significativo en la proporción de células supervivientes basándose en sus fenotipos respectivos (Figura 5c). Aunque inicialmente las células que presentaron el fenotipo GFP-positivo representaron el $87,5 \pm 10,4\%$ de la población total, se observó que después del tratamiento este fenotipo disminuyó, constituyendo solo el $28,3 \pm 10,6\%$ de la población de células totales ($p < 0,001$). A diferencia, las células con el fenotipo GFP-negativo

aumentaron proporcionalmente del $6,4 \pm 4,3 \%$ al $73,1 \pm 10,2 \%$ de la población total después del tratamiento ($p < 0,001$). Ensayos de formación de colonias de células estables DU145-promotor de CK19-GFP clasificadas por expresión de GFP/clase I de HLA confirmaron estos resultados, ya que solo las células tumorales con un fenotipo GFP-negativo/clase I de HLA-negativo fueron capaces de formar clones cuando se expusieron continuamente a docetaxel (Figura 5d). Los ensayos de formación de colonias confirmaron estos resultados, ya que solo las células tumorales con un fenotipo GFP-negativo fueron capaces de formar clones cuando se expusieron continuamente a docetaxel (Figura 5d). Así, los resultados subrayan la existencia de una población de células con un fenotipo no diferenciado (CK-negativo/clase I de HLA-negativo) que se libra de la quimioterapia convencional y podría ser responsable de la recaída tumoral.

[0102] También se demostró que la subpoblación de células tumorales con un fenotipo CK-negativo/clase I de HLA-negativo/GFP-negativo tenía la propiedad de células madre única de diferenciarse mediante división celular asimétrica. Cuando se siembran células estables DU145-promotor de CK19-GFP no clasificadas, se observó que mediante tal proceso las células GFP-negativo dan lugar a células hija que entran en el programa de diferenciación (se vuelven GFP-positivo), mientras que la célula GFP-negativo retiene su identidad original (Figura 6a). A diferencia, las células que presentan un fenotipo GFP-positivo se dividieron simétricamente, que significa que todas las células hija continúan poseyendo las mismas características. El análisis de citometría de flujo de células clasificadas por GFP estables DU145-promotor de CK19-GFP cultivadas durante 4 semanas reveló que después de este periodo de tiempo, las células derivadas de células clasificadas GFP-negativo estuvieron principalmente constituidas por células diferenciadas (GFP+), mientras que las células cultivadas de células clasificadas GFP-positivo mantuvieron el fenotipo diferenciado (Figura 6b). Así, este resultado explica el hecho de que las células CK-negativo/clase I de HLA-negativo representen una minoría de la población de células tumorales dentro de las líneas celulares parentales, mientras que grandes conjuntos de células malignas diferenciadas constituyen la parte principal de esta población de células total.

[0103] Finalmente, se trató la propiedad de células madre de cáncer funcional de la iniciación tumoral en las subpoblaciones identificadas de células. Se clasificaron células estables DU145-promotor de CK19-GFP por expresión de GFP/clase I de HLA y las subpoblaciones de células clasificadas por GFP se inyectaron por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes NOD/SCID y solo las células GFP-negativo/clase I de HLA-negativo presentaron capacidad de iniciación tumoral (Figura 6c). La inyección de 10 células con el fenotipo GFP-negativo produjo tumores en el $63,0 \pm 14,6 \%$ de los receptores, mientras que no se observó formación tumoral después de la inyección de la misma cantidad de células GFP-positivo (Figura 6d).

[0104] Con el fin de confirmar adicionalmente los hallazgos observados en los que solo las células de fenotipo DU145 CK-negativo/clase I de HLA-negativo/GFP-negativo mostraron capacidad de iniciación tumoral, líneas celulares parentales (DU145 y 22RV1) se clasificaron basándose en la expresión del marcador superficial antígeno de la clase I de HLA y se probó su capacidad de iniciación tumoral. (Figuras 13 y 15). Similar a los resultados obtenidos con las células GFP-negativas, solo las células clase I de HLA-negativo presentaron capacidad de iniciación tumoral después de los ensayos de dilución. La inyección de 10 células DU145 y 22RV1 clase I de HLA-negativo produjo tumores en el $83,3 \pm 19,1 \%$ y el 100% de los receptores, respectivamente, mientras que no se observó la formación tumoral después de 198 días de inyección con 10 células que presentan un fenotipo clase I de HLA-positivo. Se obtuvieron resultados similares después del trasplante en serie de xenoinjertos de tumor generados por la clase I de HLA-negativo (datos no mostrados).

[0105] Así, la propiedad de células madre de cáncer funcional de iniciación tumoral fue intrínseca a la población de células con un fenotipo CK-negativo/clase I de HLA-negativo. Adicionalmente, además de ser las únicas células dotadas con capacidad de iniciación tumoral, las células clase I de HLA-negativo también presentaron una mayor capacidad de clonabilidad estadísticamente significativa cuando se compararon con células clase I de HLA-positivo (Figura 8). Y, lo que es más importante, pero no sorprendentemente, los tumores generados a partir de células GFP-negativo xenotrasplantadas presentaron un fenotipo diferenciado (GFP-positivo/CK-positivo/HLA-positivo) (Figura 6c), y retuvieron una pequeña población de células GFP-negativo/HLA-negativo que representaron el $3,93 \pm 0,85 \%$ de la población tumoral total (Figura 16).

[0106] Tomados conjuntamente, los resultados *in vitro* e *in vivo* identifican una población de células con un fenotipo CK-negativo/clase I de HLA-negativo con capacidad de iniciación tumoral, que mediante la división celular asimétrica genera clonógenos de amplificación del tránsito que pueblan abrumadoramente el tumor en evolución con células diferenciadas. Así, confirmando el descubrimiento de una célula madre de cáncer de próstata. Considerando todos los resultados descritos anteriormente, que incluyen el distintivo de estaminalidad y la capacidad de iniciación tumoral de las células resistentes a docetaxel recientemente generadas, se planteó la hipótesis de que la quimioterapia inducía un enriquecimiento de las células madre de cáncer de próstata (Figura 9a). Como las células resistentes a docetaxel presentaron regulación por disminución de los marcadores de diferenciación epitelial, que incluyen CK19 y CK18, la población CK-negativo de células se cuantificó inicialmente en las líneas parentales. El análisis de citometría de flujo reveló que ambas células parentales poseyeron subpoblaciones CK19 y CK18 negativo dispersas (Figura 6a). Las células 22RV1 presentaron el $3,4 \%$ de células CK19 y el $4,7 \%$ de CK18 negativo. Similarmente, las células DU145 mostraron el $2,1 \%$ de células CK19 y el $2,3 \%$ de CK18 negativo. Además, 22RV1 tuvo un $2,6 \%$ y DU145 tuvo un $1,3 \%$ de células CK negativo cuando se co-tiñeron con ambas CK.

Por tanto, la tinción por inmunofluorescencia confirmó la presencia de tanto una subpoblación CK negativo rara como una subpoblación dominante co-que expresa ambas CK.

EJEMPLO 3

5 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER EN MUESTRAS DE TUMOR DE PRÓSTATA METASTÁSICO HUMANO

10 [0107] En vista de los resultados anteriores, se investigó si la población de células madre de cáncer de próstata identificada estaba presente en muestras de tejido de cáncer de próstata humano. Los estudios inmunohistoquímicos de tejidos de cáncer de próstata humano con metástasis (n=20) y primario (n=6) emparejados revelaron una subpoblación dispersa de células tumorales CK-negativo (Figura 7a). Estas células también fueron negativas para antígenos de la clase I de HLA (Figura 7b), presentaron activación de factores de transcripción en desarrollo clave (Figura 7c) y carecieron de la expresión de marcadores de diferenciación relacionados con la 15 próstata (Figura 7d) correspondientes al distintivo de estaminalidad previamente observado en estudios *in vitro*.

20 [0108] Todos los especímenes de cáncer de próstata humano analizados contuvieron subpoblaciones dispersas de células tumorales CK-negativo (CK18 y CK19), representando del 0,05 % al 0,3 % y del 0,4 % al 1,8 % de todas las células tumorales en lesiones primarias y metastásicas, respectivamente (Figura 7a). A continuación, se realizó tinción doble basada en inmunofluorescencia para evaluar la asociación entre la expresión de CK y los marcadores de interés. En este análisis, se observó coherentemente que la expresión de CK estaba asociada significativamente a la expresión de la clase I de HLA ($p < 0,0001$). Más específicamente, se observó que la población tumoral CK-negativo no expresó antígenos de la clase I de HLA en el $97,8 \pm 0,7$ % de las células. Sin embargo, todas (100 %) las células CK-positivo presentaron un fenotipo de antígeno de la clase I de HLA positivo (Figura 7b). Además, se 25 encontró repetidamente que las células tumorales CK-negativo/HLA-negativo tuvieron un aumento significativo ($p < 0,0001$) de la expresión nuclear (activación) de factores de transcripción en desarrollo cuando se compararon con células CK-positivo/HLA-positivo diferenciadas. Las células CK-negativo/HLA-negativo presentaron expresión nuclear de β -catenina desfosforilada en el $63,9 \pm 22,6$ % de las células, Notch2 escindido en el $72,8 \pm 15,1$ %, Gli1 en el $67,5 \pm 17,3$ % y Gli2 en el $67 \pm 17,3$ %, mientras que las células CK-positivo/HLA-positivo expresaron β -catenina desfosforilada nuclear en solo el $5,8 \pm 11,9$ % de las células, Notch2 escindido en el $6,7 \pm 7,9$ %, Gli1 en el $1,2 \pm 7,9$ % y Gli2 en el $1,5 \pm 10,6$ % (Figura 7c). Además, también se observó que las células tumorales CK-negativo/clase I de HLA-negativo no mostraron expresión de AR nuclear, mientras que las células CK-positivo/HLA-positivo presentaron AR nuclear en el $71,8 \pm 14,3$ % de las células (Figura 7d). Así, el hecho de que las células madre de cáncer de próstata no muestren un fenotipo AR positivo sugiere que estas células pueden no ser 35 dependientes de una señalización de AR funcional, que explicaría cómo estas células podrían ser responsables de la recaída observada después de la terapia con hormonas, una cuestión a perseguir en estudios futuros. Tomados conjuntamente, estos resultados confirman la existencia y la capacidad para identificar una subpoblación de células madre de cáncer de próstata en muestras de tejido de cáncer de próstata humano.

40 [0109] Dado que la población de células madre de cáncer se identificó en tanto cáncer de próstata primario como metastásico, se diseñaron una serie de experimentos que pretendían investigar la capacidad tumorigénica de tal población de células de muestras tumorales humanas frescas. Para evaluar si las células de cáncer de próstata con tal fenotipo eran responsables de la iniciación tumoral, se obtuvieron tumores de 48 pacientes que se sometieron a prostatectomía radical para cáncer de próstata primario (Tabla 4). Las células se aislaron por citometría de flujo basándose en la expresión del marcador superficial celular la clase I de HLA (Figura 9a). Este análisis mostró que 45 todas las muestras de cáncer de próstata primario estaban principalmente constituidas por células clase I de HLA-positivo que representaron una mediana del $98,9 \pm 0,35$ % (intervalo 98,7 %-99,5 %) de la población total, mientras que solo un pequeño porcentaje de la mediana de células $1,2 \pm 0,65$ % (intervalo 0,5 %-1,5 %) mostró un fenotipo clase I de HLA-negativo, estando este resultado de acuerdo con los hallazgos inmunohistoquímicos anteriormente informados. A continuación, el mismo número (10 , 10^2 y 10^3) de células clase I de HLA-negativo, clase I de HLA-positivo y no clasificadas mezcladas con Matrigel se inyectaron en ratones NOD/SCID. En general, 4 (8,3 %) de los 48 tumores de xenoinjerto se desarrollaron a partir de la inyección de células de cáncer de próstata primario después de una mediana del tiempo de seguimiento de 34,5 semanas (intervalo 21,0-45,3). 20,8 semanas (intervalo 9,3-39,6), y solo las células HLA-negativo pudieron mantener su potencial tumorigénico tras el trasplante en serie 55 cuando se compararon con las células HLA-positivo (Figura 9b y Tabla 5 a continuación).

TABLA 4

Características clínico-patológicas y porcentaje de células HLA-negativo en los 48 tumores de próstata primarios humanos frescos inyectados

Caso N.º	Estadio	Puntuación de Gleason	PSA pre-operatorio	% de células HLA-negativo
1	pT2c,pN0	7 (3+4)	4,4	1,1
2	pT2c,pN0	7 (3+4)	2	1,2
3	pT2c,pN0	6 (3+3)	3,6	1,3
4	pT2c,pN0	7 (3+4)	3,3	0,5

Caso N.º	Estadio	Puntuación de Gleason	PSA pre-operatorio	% de células HLA-negativo
5	pT2c,pN0	7 (3+4)	1,16	0,7
6	pT2c,pN0	9 (4+5)	6,1	1,1
7	pT2c,pN0	7 (3+4)	4,2	1,2
8	pT2c,pN0	7 (3+4)	4,67	1,5
9	pT2c,pN0	7 (3+4)	4,3	1,1
10	pT2c,pN0	8 (4+4)	4	0,9
11	pT2c,pN0	7 (4+3)	4,4	0,7
12	pT2c,pN0	7 (3+4)	5,9	0,8
13	pT2c,pN0	7 (3+4)	23	0,6
14	pT3a,pN0	7 (3+4)	9,2	1,1
15	pT3b,pN0	8 (4+4)	6,2	1,4
16	pT3a,pN0	9 (4+5)	5,9	1,2
17	pT3a,pN0	7 (3+4)	4,5	1,2
18	pT3a,pN0	7 (3+4)	5,92	0,6
19	pT3b,pN1	8 (4+4)	24	1,5
20	pT3b,pN0	7 (3+4)	9,8	1,3
21	pT2c,pN0	7 (3+4)	3,1	1,5
22	pT2c,pN0	6 (3+3)	4,8	1,1
23	pT3a,pN0	7 (3+4)	9,1	1,4
24	pT2c,pN0	7 (3+4)	2,7	1,2
25	pT2c,pN0	7 (3+4)	4,1	0,5
26	pT3a,pN0	9 (5+4)	8,4	1,1
27	pT4,pN1	9 (4+5)	30	0,8
28	pT2c,pN0	7 (3+4)	8	1,5
29	pT2a,pN0	6 (3+3)	2,4	1,2
30	pT2c,pN0	7 (3+4)	5,4	0,6
31	pT2a,pN0	7 (3+4)	1	1,2
32	pT2c,pN0	7 (3+4)	4,32	1,5
33	pT2c,pN0	7 (3+4)	5,93	1,5
34	pT2c,pN0	7 (3+4)	7,1	0,6
35	pT1a,pN0	7 (3+4)	N/A	0,5
36	pT2c,pN0	7 (3+4)	7	1,4
37	pT2c,pN0	7 (3+4)	6	1,4
38	pT2c,pN0	7 (3+4)	8,8	1,3
39	pT2c,pN0	7 (3+4)	3,9	1,5
40	pT2c,pN0	7 (3+4)	5,4	1,2
41	pT3a,pN1	7 (4+3)	21,4	1,5
42	pT2c,pN0	7 (4+3)	7,4	1,5
43	pT2c,pN0	7 (3+4)	5,52	1,1
44	pT2c,pN0	7 (3+4)	2,24	0,5
45	pT2c,pN0	6 (3+3)	7,1	0,7
46	pT2b,pN0	8 (3+5)	6,22	1,5
47	pT2a,pN0	6 (3+3)	4,6	0,9
48	pT2c,pN0	6 (3+3)	2,5	1,2

Nota: Marcados en recuadros grises de los que se desarrollaron xenoinjertos tumorales

5 [0110] La Tabla 5 resume la capacidad de iniciación tumoral medida por la incidencia tumoral (tumores/inyecciones) y las latencias tumorales en semanas (media \pm DE), cuando se inyectaron 10, 100 y 1000 células clasificadas y no clasificadas por clase I de HLA de tejidos de cáncer de próstata primario. Se inyectaron dos veces cuatro ratones para cada población de células clasificadas y dilución de célula en el flanco superior (HLA-negativo) y flanco inferior (HLA-positivo). También se inyectaron las células no clasificadas de cada espécimen tumoral.

TABLA 5
Inyecciones primarias **Inyecciones secundarias**

Paciente	Expresión de la clase I de HLA	Inyecciones primarias			Inyecciones secundarias		
		Tumores/ Células/inyección	Latencia tumoral Células/inyección	Tumores/ Células/inyección	Tumores/ Células/inyección	Latencia tumoral Células/inyección	Tumores/ Células/inyección
N.º 5	negativa	5/8	20,2 ± 3,4	12,6 ± 3,9	8/8	19,9 ± 2,7	13,8 ± 2,8
	positiva	0/8	-	26,8 ± 4,0	0/8	1/8	23,8
N.º 9	no clasificada	2/8	27,8 ± 4,6	21,0 ± 2,5	4/8	23,4 ± 3,5	23,1 ± 6,4
	negativa	7/8	15,5 ± 3,2	10,8 ± 1,5	7/8	14,2 ± 2,5	10,3 ± 1,5
N.º 12	positiva	0/8	-	22,4	0/8	-	-
	no clasificada	2/8	22,0 ± 2,8	15,3 ± 3,6	1/8	23,5	14,7 ± 3,2
N.º 24	negativa	6/8	19,4 ± 2,0	12,6 ± 3,6	8/8	20,3 ± 4,5	16,6 ± 2,5
	positiva	0/8	-	-	0/8	-	-
N.º 24	no clasificada	1/8	23,4	22,2 ± 3,6	0/8	-	19,5 ± 1,5
	negativa	3/8	25,3 ± 4,9	20,9 ± 5,4	0/8	2/8	15,2 ± 3,9
N.º 24	positiva	0/8	-	-	0/8	-	-
	no clasificada	0/8	-	26,5 ± 3,5	0/8	0/8	-

[0111] Después de la inyección primaria de 10^3 células, se observó que una capacidad significativamente mayor de iniciación tumoral era de las células clasificadas HLA-negativo ($87,5 \pm 17,6$ %) cuando se comparó con las células HLA-positivo ($12,5 \pm 17,6$ %), un hecho que se asoció a una menor latencia tumoral en los xenoinjertos HLA-negativo ($14,2 \pm 4,5$ frente a $24,6 \pm 3,1$ semanas). Además, la dilución adicional en 10^2 y 10^3 células reveló que solo las células HLA-negativo estuvieron dotadas de capacidad de iniciación tumoral. Estas observaciones se confirmaron por experimentos de trasplante secundario en los que la inyección de 10^2 y 10^3 células clasificadas continuó demostrando que el desarrollo de tumor estaba limitado a la subpoblación HLA-negativo de células (Figura 9b). Las inyecciones secundarias de células clasificadas por HLA de los xenoinjertos raramente generados a partir de células HLA-positivo confirmaron este resultado, ya que las células HLA-positivo no poseyeron capacidad de iniciación tumoral. Los análisis histológicos e inmunohistoquímicos revelaron que los tumores derivados de células clasificadas HLA-negativo reprodujeron fielmente el fenotipo del tumor humano primario original (Figura 9c), que muestra expresión de antígenos de la clase I de HLA en la mayoría de sus células tumorales, además de marcadores epiteliales y relacionados con la próstata (CK y AR). Así, estos resultados muestran que la población HLA-negativo está enriquecida en células capaces de iniciar los xenoinjertos de cáncer de próstata en ratones NOD/SCID, y reproducir la heterogeneidad molecular y fenotípica distintiva de la mayoría de los cánceres humanos.

[0112] Además, parece que esto es un fenómeno universal, debido a que las células tumorales HLA-negativo se aislaron de una variedad de neoplasias sólidas humanas frescas, que incluyen carcinomas de colon, mama, pulmón y vejiga que son responsables de la iniciación tumoral cuando se inyectan en serie en ratones NOD/SCID (Figura 9d, y Tabla 6 a continuación). En general, 4 de 10 (40 %) tumores de xenoinjerto de colon, 2 de 10 (20 %) de pulmón, 2 de 12 (16,6 %) de mama y 2 de 18 (11,1 %) de vejiga se desarrollaron a partir de la inyección de muestras tumorales humanas frescas. Las características de otros tipos de tumor sólido primario se muestran en la Tabla 7 a continuación. La capacidad de iniciación tumoral y las latencias tumorales de células clasificadas por HLA de otros tipos de tejido de cáncer sólido se muestran en la Tabla 8 a continuación.

25 TABLA 6

Paciente	Clase I de HLA	Inyecciones primarias		Inyecciones secundarias		
		Tumores/ inyecciones	Latencia tumoral	Tumores/ inyecciones	Latencia tumoral	
Colon	N.º 3	negativo	6/8	$16,0 \pm 3,1$	8/8	$18,3 \pm 4,6$
		positivo	0/8	-	0/8	-
	N.º 5	negativo	8/8	$8,5 \pm 3,3$	8/8	$7,0 \pm 2,5$
		positivo	2/8	$28,5 \pm 2,1$	0/8	-
	N.º 6	negativo	8/8	$10,3 \pm 3,5$	8/8	$9,9 \pm 4,6$
		positivo	0/8	-	0/8	-
Pulmón	N.º 9	negativo	7/8	$10,4 \pm 3,9$	8/8	$11,0 \pm 3,6$
		positivo	0/8	-	0/8	-
	N.º 4	negativo	5/8	$15,3 \pm 2,9$	8/8	$12,9 \pm 2,6$
		positivo	0/8	-	0/8	-
Mama	N.º 8	negativo	7/8	$11,9 \pm 3,2$	8/8	$10,3 \pm 2,1$
		positivo	1/8	27,0	0/8	-
	N.º 2	negativo	8/8	$6,9 \pm 2,9$	8/8	$6,5 \pm 3,3$
		positivo	0/8	-	0/8	-
Vejiga	N.º 8	negativo	4/8	$17,0 \pm 5,8$	6/8	$16,8 \pm 5,2$
		positivo	0/8	-	0/8	-
	N.º 11	negativo	4/8	$15,7 \pm 5,4$	5/8	$16,6 \pm 3,2$
		positivo	0/8	-	0/8	-
Vejiga	N.º 16	negativo	8/8	$7,9 \pm 2,7$	8/8	$7,5 \pm 3,9$
		positivo	3/8	$13,7 \pm 4,0$	0/8	-

TABLA 7

Características de otros tipos de tumores sólidos primarios.

Caso N.º	Tipo de tumor	Diagnóstico histológico	Grado	Estadio	% de células HLA-negativo
1	colon	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT4,pN2	1,2
2	colon	Adenocarcinoma	Mal diferenciado	pT3,pN0	0,9
3	colon	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT3a,pN0	1,5
4	colon	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT3,pN0	0,9
5	colon	Adenocarcinoma mucinoso	Moderadamente diferenciado	pT3a,pN0	1,1
6	colon	Adenocarcinoma	Mal diferenciado	pT3c,pN2	1,5
7	colon	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT3,pN1	1,3
8	colon	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT3,pN0	1,3
9	colon	Adenocarcinoma	Bien diferenciado	pT4,pN1	0,9
10	colon	Adenocarcinoma	Mal diferenciado	pT3,pN1	1,4
1	pulmón	Carcinoma de células grandes	Mal diferenciado	pT2,pN1	0,8
2	pulmón	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT1,pN0	1,2
3	pulmón	Carcinoma de células escamosas	Moderadamente diferenciado	pT1,pN0	1,0
4	pulmón	Adenocarcinoma	Mal diferenciado	pT3,pN0	1,5
5	pulmón	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT2,pN0	0,9
6	pulmón	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT2,pN1	1,3
7	pulmón	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT3,pN1	1,4
8	pulmón	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT1,pN0	0,9
9	pulmón	Adenocarcinoma	Moderadamente diferenciado	pT2,pN0	0,7
10	pulmón	Adenocarcinoma	Mal diferenciado	pT2,pN0	1,2
1	mama	Adenocarcinoma ductal	Moderadamente diferenciado	pT1c,pN0	0,8
2	mama	Adenocarcinoma ductal	Mal diferenciado	pT1c,pN1a	1,2
3	mama	Adenocarcinoma ductal	Moderadamente diferenciado	pT1c,pN0	1,4
4	mama	Adenocarcinoma ductal	Mal diferenciado	pT2,pN1	1,5
5	mama	Adenocarcinoma ductal	Moderadamente diferenciado	pT1c,pN1c	0,6
6	mama	Adenocarcinoma ductal	Mal diferenciado	pT1c,pN1mi	0,8
7	mama	Adenocarcinoma ductal	Moderadamente diferenciado	pT1c,pN0	1,0
8	mama	Adenocarcinoma ductal	Mal diferenciado	pT2,pN1a	1,0
9	mama	Adenocarcinoma ductal	Moderadamente diferenciado	pT1c,pN0	0,6
10	mama	Adenocarcinoma ductal	Mal diferenciado	pT2,pN0	1,4
11	mama	Adenocarcinoma ductal	Moderadamente diferenciado	pT2,pN0	0,9
12	mama	Adenocarcinoma ductal	Moderadamente diferenciado	pT1cN0	1,2
1	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pTa,pN0	0,5
2	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT1a,pN0	0,7
3	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT3,pN0	1,4
4	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT4a,pN0	1,5
5	vejiga	Carcinoma urotelial	Bajo grado	pTa,pN0	0,9
6	vejiga	Carcinoma de células escamosas	Mal diferenciado	pT4,pN0	1,5
7	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pTa,pN0	0,6
8	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT3a,pN0	1,4
9	vejiga	Carcinoma urotelial	Bajo grado	pTa,pN0	0,7
10	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT3a,pN0	1,4
11	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT3,pN0	1,0
12	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT3a,pN0	1,4
13	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT3,pN0	0,9
14	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT1,pN0	0,7
15	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT3a,pN0	1,3
16	vejiga	Carcinoma urotelial	Bajo grado	pTa,pN0	0,7
17	vejiga	Carcinoma urotelial	Alto grado	pT3a,pN0	1,3
18	vejiga	Carcinoma de células escamosas	Bien diferenciado	pT1,pN0	0,6

Nota: Marcados en recuadros grises de los que se desarrollaron xenoinjertos tumorales

TABLA 8

Capacidad de iniciación tumoral y latencias tumorales de células clasificadas por HLA de otros tipos de tejido de cáncer sólido

5

	Paciente	Clase I de HLA	Inyecciones primarias		Inyecciones secundarias	
			Tumores/ inyecciones	Latencia tumoral	Tumores/ inyecciones	Latencia tumoral
Colon	N.º 3	negativo	6/8	16,0 ± 3,1	8/8	18,3 ± 4,6
		positivo	0/8	-	0/8	-
	N.º 5	negativo	8/8	8,5 ± 3,3	8/8	7,0 ± 2,5
		positivo	2/8	28,5 ± 2,1	0/8	-
	N.º 6	negativo	8/8	10,3 ± 3,5	8/8	9,9 ± 4,6
		positivo	0/8	-	0/8	-
N.º 9	negativo	7/8	10,4 ± 3,9	8/8	11,0 ± 3,6	
	positivo	0/8	-	0/8	-	
Pulmón	N.º 4	negativo	5/8	15,3 ± 2,9	8/8	12,9 ± 2,6
		positivo	0/8	-	0/8	-
	N.º 8	negativo	7/8	11,9 ± 3,2	8/8	10,3 ± 2,1
positivo		1/8	27,0	0/8	-	
Mama	N.º 2	negativo	8/8	6,9 ± 2,9	8/8	6,5 ± 3,3
		positivo	0/8	-	0/8	-
	N.º 8	negativo	4/8	17,0 ± 5,8	6/8	16,8 ± 5,2
		positivo	0/8	-	0/8	-
Vejiga	N.º 11	negativo	4/8	15,7 ± 5,4	5/8	16,6 ± 3,2
		positivo	0/8	-	0/8	-
	N.º 16	negativo	8/8	7,9 ± 2,7	8/8	7,5 ± 3,9
		positivo	3/8	13,7 ± 4,0	0/8	-

[0113] La Tabla 8 resume la capacidad de iniciación tumoral medida por la incidencia tumoral (tumores/inyecciones) y latencias tumorales en semanas (media ± DE), cuando se inyectaron 100 células clasificadas por la clase I de HLA de otros tipos de tejido tumoral primario. Se inyectaron dos veces cuatro ratones para cada población de células clasificadas y dilución celular en el flanco superior (HLA-negativo) y el flanco inferior (HLA-positivo).

[0114] Después de la inyección primaria, la capacidad de iniciación tumoral de 10² células HLA-negativo fue significativamente mayor cuando se comparó con células clasificadas HLA-positivo. Y, lo que es más importante, tras el trasplante en serie solo las células HLA-negativo retuvieron la capacidad tumorigénica, mientras que no las células clase I de HLA-positivo. Además, inyecciones secundarias de células HLA-positivo clasificadas de xenoinjertos generados a partir de células HLA-positivo no poseyeron capacidad de iniciación tumoral. La generación de tumores a partir de las células clase I de HLA-positivo pudo producirse debido a la posible contaminación de células clase I de HLA-negativo durante la clasificación de células, aunque no puede excluirse que las células clase I de HLA-positivo puedan tener una baja capacidad de iniciación tumoral que no puede mantenerse después del trasplante en serie. El análisis histológico de los tumores de xenoinjerto desarrollados mostró características morfológicas similares a las de sus cánceres primarios humanos correspondientes (Figura 9e). Así, se ha identificado una población HLA-negativo con capacidad de iniciación tumoral en tipos de tumor epitelial humano, además de cáncer de próstata.

[0115] Finalmente, la capacidad de iniciación tumoral de células de muestras de tejido humanas frescas no estuvo relacionada con ninguna de las características clínico-patológicas analizadas de los pacientes con cáncer, ni asociada al porcentaje de células HLA-negativo. Los tumores con características clínico-patológicas agresivas (por ejemplo, alto grado, estadio tumoral alto) o tumores con un alto número/porcentaje de células HLA-negativo (por ejemplo, 1,5 %) no poseyeron una capacidad significativamente mayor de iniciación tumoral. Además, no se observó asociación entre el porcentaje de células HLA-negativo y ningún estadio tumoral o grado tumoral.

EJEMPLO 4

DIRECCIONAMIENTO DE LA CÉLULA MADRE DE CÁNCER HUMANA

[0116] Basándose en el hecho de que las células madre de cáncer identificadas presentaron activación de vías de Hedgehog y de Notch, se hizo la prueba en cuanto a si la inhibición de tales vías podría alterar la homeostasis de las células madre de cáncer. Para este fin se utilizó ciclopamina, un antagonista de la vía de Hedgehog derivado de planta que actúa al nivel de Smo (Taipale et al., 2000; Karhadkar et al., 2004; Chen et al., 2002). El compuesto E es un inhibidor de gamma-secretasa altamente activo que bloquea el procesamiento proteolítico de receptores de Notch (Seiffert et al., 2000). Para los experimentos *in vitro* se usó DBZ, un inhibidor de gamma-secretasa altamente activo

con actividad establecida *in vivo* como sustituto del Compuesto E en los experimentos *in vivo* brevemente expuestos a continuación (van Es *et al.*, 2005).

5 **[0117]** La exposición de la población de células madre de cáncer CK-negativo/HLA-negativo de DU145 y 22RV1 a cada inhibidor individual no indujo ningún efecto importante. Sin embargo, cuando ambos agentes se administraron juntos se observó una robusta inhibición en la progresión del ciclo celular con una acumulación de células en sub-G1, mientras que este efecto fue menor en células diferenciadas (CK-positivo/HLA-positivo) (Figura 10a). Debido a que la dexametasona se usa para reducir la toxicidad intestinal de inhibidores de gamma-secretasa en experimentos *in vivo* (Real *et al.*, 2009), se analizaron los efectos *in vitro* de la dexametasona en combinación con los inhibidores
10 anteriormente mencionados. Este análisis mostró que la dexametasona no cambió los efectos del ciclo celular de inhibidores Hedgehog y Notch (datos no mostrados). Además, el efecto combinado de estos fármacos se confirmó adicionalmente por ensayos de formación de colonias, ya que no se formaron colonias después de 21 días cuando se combinaron los inhibidores Hedgehog y Notch (Figura 10b). A continuación, para determinar si la inhibición de estas vías podría afectar la capacidad de iniciación tumoral de las células madre de cáncer *in vivo*, se inyectaron 10³
15 células DU145 y 22RV1 CK-negativo/HLA-negativo por vía subcutánea en ratones NOD/SCID y se trataron con solución de vehículo (control), dexametasona sola, combinación dual (por ejemplo, dexametasona más ciclopamina) o combinación triple (dexametasona más ciclopamina más DBZ) de los fármacos. Los ratones tratados con la combinación triple mostraron un retraso significativo ($p < 0,05$) en la primera palpabilidad tumoral de 5,1 semanas en DU145 y 3,8 semanas en xenoinjertos 22RV1, mientras que este retraso tumoral no fue significativo en ratones
20 tratados con inhibidores Hedgehog o Notch solos (Figura 10c).

[0118] Finalmente, se probaron los efectos inhibidores de la iniciación tumoral de estos compuestos en xenoinjertos derivados de tejidos de cáncer de próstata humano frescos. Se inyectaron 10³ células clasificadas por HLA-negativo de los xenoinjertos N.º 5, N.º 9 y N.º 12 en ratones NOD/SCID y se trataron con los mismos programas
25 y combinaciones de inhibidores Hedgehog y Notch, como se ha descrito anteriormente. Como se ha observado previamente en las líneas celulares, solo el tratamiento combinado con inhibidores Hedgehog y Notch retardó significativamente ($p < 0,05$) la iniciación tumoral (Figura 10d). Los xenoinjertos de tumor en ratones tratados con la triple combinación de fármacos fueron palpables por primera vez después de 18,3 ± 3,1, 13,8 ± 2,5 y 20,1 ± 3,3 semanas, en comparación con 13,8 ± 2,5, 10,3 ± 1,5 y 16,6 ± 2,5 semanas en sus controles correspondientes.
30

[0119] Tomados conjuntamente, estos resultados muestran que la inhibición de estas vías de desarrollo se dirige a la población de células madre de cáncer retrasando la iniciación tumoral.

[0120] Se han postulado dos hipótesis importantes referentes a la iniciación tumoral. El “modelo estocástico” que predice que cada célula neoplásica puede generar un tumor completamente nuevo; y el “modelo de células madre
35 de cáncer” que propone que las células tumorales existen en un estado jerárquico, y que solo algunas células madre poseen potencial de iniciación tumoral. Se desvela la identificación y caracterización funcional de una célula madre de cáncer humano, que cumple los siguientes criterios de estaminalidad: 1) la autorrenovación y diferenciación mediante la división celular asimétrica, 2) capacidad de iniciación tumoral, 3) un distintivo de histocompatibilidad
40 negativo, y 4) un fenotipo de resistencia multi-fármaco.

[0121] Un fenotipo HLA-negativo también es compartido por células madre embrionarias. Se ha informado que los embriones de pre-implantación humanos son clase I y clase II de HLA negativo (Desoye *et al.*, 1988). Este fenómeno excluye el rechazo basado en la expresión de antígenos paternos, hasta que se desarrolle una barrera sangre-tejido,
45 que en esta situación es la placenta. En el contexto de las células madre de cáncer, un fenotipo negativo de histocompatibilidad tal tiene implicaciones clínicas importantes, ya que explica la permisividad de las mutaciones del huésped, además de la diseminación tumoral y las capacidades metastatogénicas, ya que las células madre de cáncer escaparían de la inmuno-vigilancia.

[0122] Referente a la capacidad de iniciación tumoral, se desvela que solo las células madre de cáncer CK-negativo/HLA-negativo identificadas generan tumores *in vivo*, mientras que las progenies CK-positivo/HLA-positivo diferenciadas carecen de tal propiedad. Sin embargo, parece que estas células madre de cáncer presentan memoria genética independiente de ciertas interacciones del estroma, ya que las inyecciones subcutáneas confieren el
50 fenotipo de tejido de origen sin la necesidad de implantación ortotópica, un fenómeno que necesita ser investigado adicionalmente. Además, debido a su fenotipo homogéneo, se planteó la hipótesis de que estas células fueran genéticamente estables, una propiedad facilitada por su estado quiescente y división asimétrica. Esta estabilidad genética permitiría la identificación de mutaciones “conductoras”, ya que la heterogeneidad molecular sería esencialmente un producto de la expansión tumoral y poblaciones de células cancerosas diferenciadas, y probablemente no tan crítico para la tumorigénesis. Una nueva clasificación molecular de tumores humanos podría derivarse probablemente del análisis de tales mutaciones “conductoras” en estas poblaciones de células madre de
60 cáncer.

[0123] En resumen, se ha identificado y caracterizado una célula madre de cáncer de próstata recién definido en líneas de células cancerosas humanas y muestras de tejido. Además, esta población de células se aisló usando el
65 marcador superficial clase I de HLA, y se demostró su capacidad de iniciación tumoral. Además, se observó que poblaciones de CSC similares también están presentes en carcinomas humanos de mama, colon, pulmón y vejiga,

un hecho que da universalidad adicional a estos hallazgos. El descubrimiento de esta célula madre de cáncer humano tiene importantes implicaciones clínicas en los ensayos de laboratorio de diagnóstico y predictivos, además de para el desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas. En este contexto, el tratamiento con inhibidores Notch y Hedgehog atenúa la formación tumoral en modelos animales experimentales.

5

EJEMPLO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

10 Inhibidores y fármacos

[0124] Docetaxel, mitoxantrona, doxorubicina, cisplatino, vinorelbina, paclitaxel, dexametasona, ciclopamina y el Compuesto E se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). DBZ [(2S)-2-[2-(3,5-difluorofenil)-acetilamino]-N-(5-metil-6-oxo-6,7-dihidro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-il)-propionamida] se obtuvo de Syncom (Groningen, Los Países Bajos).

15

Cultivo celular, generación y caracterización de células con resistencia adquirida a docetaxel

[0125] Se obtuvieron líneas de células de cáncer de próstata independientes de hormonas humanas, DU-145 y 22RV1, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) complementado con 10 % de FBS sin antibióticos. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Las células DU145 y 22RV1 se seleccionaron con el fin de generar un modelo de cáncer de próstata con resistencia a docetaxel. Esta selección se basó en el hecho de que ambas líneas celulares son resistentes a hormonas, una condición tratada con docetaxel en el ámbito clínico, y que también presentan fenotipos resistentes a hormonas distintos. Mientras que las células 22RV1 son todavía dependientes de la señalización de receptores de andrógenos y expresan marcadores específicos de la próstata (por ejemplo, PSMA, receptor de andrógenos), DU145 no. Así, la generación de resistencia a docetaxel adquirida en estas dos líneas celulares fenotípicamente distintas facilitó un enfoque para estudiar los procesos moleculares implicados en la adquisición de resistencia a docetaxel. Se seleccionaron clones resistentes a docetaxel, DU-145-DR y 22RV1-DR, cultivando células con docetaxel en una manera de aumento de la dosis. El cultivo inicial fue docetaxel 5 nM. Después de que los clones sensibles ya no estuvieran presentes y las células DU-145 y 22RV1 supervivientes repoblaran el matraz, la concentración de docetaxel se aumentó a 10 nM y posteriormente a 25 nM, 50 nM, 100 nM y 250 nM. Las células 22RV1-DR se expusieron adicionalmente a docetaxel 500 nM. Después de la exposición a cada dosis creciente de docetaxel, las células supervivientes restantes se mantuvieron en medio de cultivo que contenía la última dosis de aumento de selección de docetaxel. La última concentración de selección de fármaco a la que las células se expusieron fue 250 nM para DU-145-DR y 500 nM para 22RV1-DR, con el fin de evitar la reversibilidad del fenotipo de resistencia adquirida a docetaxel. El proceso de resistencia adquirida al fármaco duró 9 meses para DU-145-DR y 6,5 meses para 22RV1-DR. En paralelo, las células DU-145 y 22RV1 parentales se expusieron a DMSO (solución de vehículo de docetaxel) en el mismo modo de aumento de dosis.

20

25

30

35

40

[0126] Las células se expusieron a dosis crecientes de docetaxel, y la quimiorresistencia adquirida se caracterizó y confirmó por ensayos de viabilidad celular, formación de colonias, anexina V y escisión de poli-(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) (Figuras 1a-d). Las células resistentes a docetaxel (DR) generadas mostraron resistencia cruzada a fármacos que dañan el ADN (mitoxantrona, doxorubicina y cisplatino), además de a otros agentes antimetabólicos (vinorelbina y paclitaxel), de acuerdo con un fenotipo resistente a multi-fármaco (datos no mostrados). También se observó que la quimiorresistencia a docetaxel era reversible (Figuras 12a y b). La eliminación del fármaco del medio de cultivo indujo una disminución significativa en la resistencia al fármaco. Después de 12 semanas de cultivo de células resistentes a docetaxel sin fármaco, la viabilidad celular disminuyó significativamente. Las concentraciones CI-50 de docetaxel para las células DU145-DR disminuyeron de 1 µM a 25 nM y en células 22RV1-DR las concentraciones CI-50 de fármaco disminuyeron de 10 µM a 50 nM (Figura 12a). Esta disminución en la resistencia a docetaxel después de la eliminación de fármaco se confirmó por ensayos de formación de colonias (Figura 12b). Así, con el fin de mantener el fenotipo de resistencia a docetaxel, las células se cultivaron continuamente bajo la última concentración de selección de fármaco.

45

50

55

Ensayos de viabilidad celular y de formación de colonias

[0127] Se analizó la viabilidad celular usando Cell titer 96 Aqous Non-Reactive Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega Corp., Madison, WI). Las células se sembraron a una densidad de 10⁴ en placas de cultivo de 96 pocillos y 24 horas después se eliminó el medio y se sustituyó con medio nuevo solo (control) o medio que contenía fármacos. Después de 72 horas, se midió la absorbancia de color en un espectrofotómetro de microplaca (Molecular Dynamics) a 450 nm (longitud de onda de prueba) y 620 nm (longitud de onda de referencia). El porcentaje de células supervivientes se estimó dividiendo la A 450 nm - A 620 nm de las células tratadas entre la A 450 nm - A 620 nm de células de control. Se realizaron ensayos de supervivencia clonogénica en respuesta al tratamiento con fármaco sembrando 10³ células en placas de cultivo de 35 mm. Después de 24 horas, las células se dejaron sin tratar (control) o se trataron con fármacos. Al día siguiente, el medio se cambió y las células se mantuvieron creciendo en medio fresco sin ningún fármaco o bajo exposición continua a fármacos. Para estos experimentos de

60

65

exposición continua, el medio más fármacos se sustituyó cada 3 días hasta que aparecieron los clones de células resistentes al fármaco. Entonces, las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído en PBS, se tiñeron con solución de cristal violeta y las colonias formadas se contaron visualmente.

5 Análisis de apoptosis por citometría de flujo

[0128] Las células (10^5) se dejaron sin tratar (control) o se trataron con fármacos durante 72 horas. Se reunieron las células adherentes y desprendidas, se lavaron y se marcaron con anexina-V-FITC y yoduro de propidio usando el kit de tinción de anexina-V-FLUOS (Roche, Nutley, NJ) según instrucciones del fabricante. Las muestras se adquirieron con un citómetro de flujo FACscan (BD Biosciences, San Jose, CA) y se analizaron con el software CellQuest Pro (BD Biosciences) para determinar el porcentaje de células que presentan tinción de anexina V.

Análisis del ciclo celular

[0129] Se trataron células con fármacos durante 72 horas, se recogieron y se fijaron en 70 % de etanol y se aguardaron a 4 °C. Antes del análisis, las células se lavaron con PBS, se centrifugaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una solución de tinción que contenía 0,1 % de Triton X, 0,2 mg/ml de RNasa y 0,02 mg/ml de yoduro de propidio. El contenido de ADN se adquirió con un citómetro de flujo FACscan (BD Biosciences) y se analizó con el software CellQuest Pro (BD Biosciences).

Análisis de micromatrices de ADNc

[0130] Se analizaron los perfiles de expresión génica de 22RV1, 22RV1-DR, DU-145 y DU-145-DR. Se aisló ARN total de cada muestra por Tryzol (Invitrogen) y se purificó por el kit RNeasy mini y el conjunto de DNasa libre de RNasa (Qiagen Inc., Valencia, CA) según los protocolos del fabricante. Se probó la calidad del ARN de todas las muestras por electroforesis de ARN y análisis en LabChip de ARN (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) para garantizar la integridad del ARN. Las muestras se prepararon para análisis con matrices Affymetrix Human U133 Plus 2.0 según las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión génica de muestras se normalizaron y se analizaron con el software Microarray Suite, MicroDB y Data Mining (Affymetrix, Santa Clara, CA). Se normalizaron la llamada absoluta (presente, marginal o ausente) y la diferencia promedio de 22.215 expresiones en una muestra, y la diferencia de llamada absoluta, cambio en veces, diferencia promedio de la expresión génica entre dos o tres muestras y se identificaron usando este paquete de software. Se hizo análisis estadístico de la diferencia promedio de la expresión media de genes, que muestra cambio ≥ 2 veces basándose en una normalización logarítmica, usando una prueba de la *t* entre muestras sensibles y resistentes a docetaxel. Los genes que no se anotaron o no se clasificaron fácilmente se excluyeron del análisis de agrupamiento funcional.

Análisis de ontología de genes

[0131] Genes diferencialmente expresados en las células resistentes a docetaxel en comparación con las células parentales sensibles generaron una lista de transcritos comúnmente desregulados. Esta lista se evaluó por DAVID Bioinformatics Resources, una prueba hipergeométrica estadística basada en web aplicada para el análisis de enriquecimiento de las categorías de ontología de genes (GO), que son, proceso biológico, función molecular y componente celular. Se tomaron en consideración las categorías de GO enriquecidas en el nivel jerárquico más alto (\geq nivel 5) a significación estadística ($p < 0,01$).

Análisis de transferencia Western

[0132] Se prepararon extractos de célula completa en tampón de muestra y se analizaron por inmunotransferencia. Se usaron los anticuerpos primarios contra poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) (BD Pharmingen, San Jose, CA), PARP escindida (BD Pharmingen), citoqueratina 19 (Abcam), citoqueratina 18 (Abcam, Cambridge, MA), receptor de andrógenos (Sigma-Aldrich), antígeno prostático específico de membrana (Abcam), antígeno específico de la próstata (Epitomics, Burlingame, CA), clase I de pan-HLA (Abcam), DKK1 (Orbigen, BioCarta LLC, San Diego, CA), β -catenina activada (Millipore, Billerica, MA), β -catenina (BD Transduction), Notch2 activado (Abcam), PTCH (Abcam), Gli1 (Santa Cruz Antibody, Santa Cruz, CA), Gli2 (Abcam) y β -actina (Sigma-Aldrich) en ensayos de inmunotransferencia usando procedimientos convencionales. La expresión de proteínas se cuantificó comparando la expresión de bandas usando el software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA).

Análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

[0133] Se realizaron análisis de inmunofluorescencia en líneas de células de cáncer de próstata y se fijaron en formalina secciones de tejido incorporadas en parafina de cánceres humanos y xenoinjertos de tumor. Los anticuerpos primarios incluyeron una combinación de citoqueratina 19 y 18 (Abcam), clase I de pan-HLA (Abcam), proteína verde fluorescente (Abcam) y los siguientes factores de transcripción: β -catenina activa (Millipore), Notch2 activado (Abcam), Gli1 (Santa Cruz), Gli2 (Abcam) y receptor de andrógenos (DAKO, Fort Collins, CO). Los anticuerpos secundarios usados fueron Alexa Fluor® 594 (Invitrogen) y Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). Las células de cáncer de próstata (10^5) se sembraron en placas de cultivo de 35 mm y 24 horas después se tiñeron por

procedimientos de inmunofluorescencia convencionales. Las secciones de tejido (5 µm) se desparafinaron y se sometieron a procedimientos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia basados en peroxidasa estándar. La cuantificación de la expresión de citoqueratinas, antígeno de la clase I de HLA, factores de transcripción y receptor de andrógenos se realizó evaluando células tumorales. El porcentaje de células positivas y negativas se determinó en 10 campos de potencia alta.

Generación del plásmido citoqueratina 19-indicador de proteína verde fluorescente (GFP)

[0134] Se amplificó la región promotora del gen CK19 de ADN genómico de células DU145 por PCR con conjuntos de cebadores específicos (Fw 5'-AACGCATGCTTTGGGGGGATG-3' (SEQ ID NO: 1) y Rv 5'-TCCCCCTTTACTCGGCCCCAC-3' (SEQ ID NO: 2)) como se describe previamente (Tripathi *et al.*, 2005). Los productos de PCR se digirieron con *Ase I* e *Hind III* y se clonaron en el vector pEGFPN1 (Clontech, Mountain View, CA) previamente digerido con las mismas enzimas. Como resultado, un promotor del CMV se eliminó del vector original y la expresión de GFP fue bajo el control del promotor de CK19. La construcción final se confirmó por digestión y análisis de secuenciación. Las células DU145 se transfectaron con la construcción pCK19-GFP usando Lipofectamine Plus 2000 (Invitrogen). Después de 24 horas, el medio se sustituyó con medio fresco y las células que se expresaban establemente se seleccionaron en presencia de G418 (Invitrogen). Los clones positivos se confirmaron por microscopía directa e inmunofluorescencia y también por amplificación por PCR de la región codificante de GFP usando cebadores específicos (Fw 5'-TTCTGCGTTATCCCCTGATTC-3' (SEQ ID NO: 3) y Rv 5'-GCTCCTCCGGCCCTTGCTCACCAT-3' (SEQ ID NO: 4)).

Obtención de imágenes de células vivas

[0135] Se usó videomicroscopía de lapso de tiempo para evaluar la división celular asimétrica y la sensibilidad de la subpoblación a docetaxel de células DU145 transfectadas establemente con el promotor pCK19-GFP. Las células que se cultivaron en placas de 6 pocillos a baja confluencia se dispusieron en la platina dentro de una cámara de la estufa de incubación a 37 °C, 50 % de humedad y en una atmósfera de 5 % de CO₂. Las películas de lapso de tiempo sin supervisión de células DU145 GFP+ y GFP- aleatoriamente elegidas se realizaron con un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti. Se usó el software NIS Elements AR (Nikon Inc., Melville, NY) para recoger y procesar datos. La obtención de imágenes se realizó usando un objetivo 10x y las imágenes se capturaron usando tiempos de exposición de 200 ms para GFP y 20 ms para campo brillante cada 30 minutos.

Análisis de subpoblaciones de células por citometría de flujo

[0136] Se llevaron a cabo análisis de citometría de flujo de subpoblaciones de células de cáncer de próstata siguiendo procedimientos convencionales. Se realizó la expresión de CK19 y CK18 intracelular en suspensiones de células individuales fijadas con 70 % de etanol, mientras que la expresión de la clase I de HLA de la superficie celular y GFP se determinó en muestras de células frescas (sin fijación). Se usaron anticuerpos primarios contra CK19 (Abcam), CK18 (Abcam), clase I de HLA (Abcam), clase I de HLA conjugado con ficoeritrina (Abcam) y GFP (Abcam). Los anticuerpos secundarios, cuando se usan, se correspondieron con Alexa Fluor® 594 (Invitrogen) y Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). Las muestras se adquirieron con un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences) y se analizaron con un software CellQuest Pro (BD Biosciences). Se midió un mínimo de 10⁴ células por muestra.

Procedimientos en ratones

[0137] El uso y cuidado de animales fue en cumplimiento estricto con las pautas institucionales establecidas por la Universidad de Columbia, Institutional Animal Care and Use Committee. Los experimentos de xenoinjerto se realizaron con ratones de 5-6 semanas de edad (NOD.CB17-Prkdc^{scid}) obtenidos de Jackson Laboratories como receptores.

Muestras de tejido de cáncer de próstata primario y metastásico humano

[0138] Se proporcionaron muestras de tejido de cáncer de próstata primario y metastásico humano incorporadas en parafina fijadas en formalina por el banco de tumores del Centro del Cáncer de la Universidad de Columbia. Todas las muestras se recogieron bajo consentimiento informado y bajo la supervisión del Comité de ética médica del Centro médico de la Universidad de la Columbia. Se seleccionaron secciones de tejido con cáncer revisando portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E).

Capacidad de iniciación tumoral de células cancerosas de líneas celulares de la próstata y muestras humanas frescas

[0139] Para comparar la capacidad de iniciación tumoral de células parentales sensibles a docetaxel y células resistentes a docetaxel, células clasificadas GFP positivo y GFP negativo, o células clasificadas HLA-positivo y HLA-negativo, se inyectaron diversos números de células (por ejemplo, 10, 10², 10³, 10⁴) por vía subcutánea en 200 µl de medio:Matrigel (1:1) en ratones macho. Las subpoblaciones de células GFP de células de cáncer de próstata se clasificaron siguiendo procedimientos convencionales. Para el aislamiento de células por clase I de HLA,

suspensiones individuales de células frescas se bloquearon con PBS + FBS 5 % y se tiñeron con un anticuerpo para la clase I de HLA directamente conjugado con ficoeritrina (Abcam). Para evaluar la capacidad de iniciación tumoral de las células cancerosas humanas de muestras de tejido de tumor fresco, se obtuvieron porciones de tumores de pacientes que se sometieron a procedimientos quirúrgicos en el Centro médico de la Universidad de Columbia mediante un protocolo aprobado por el Comité de ética médica. Se procesaron cuarenta y ocho cánceres de próstata primarios, 10 cánceres de colon primarios, 10 cánceres de pulmón primarios, 12 cánceres de mama primarios y 18 cánceres de vejiga primarios. Los especímenes se disociaron mecánicamente y se filtraron para obtener una suspensión de células individuales y se expusieron a tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma-Aldrich) para eliminar los glóbulos rojos. Las células se tiñeron con anticuerpos fluorescentes directamente conjugados con CD45 humano (Abcam), CD31 humano (eBiosciences) y HLA-clase I humano (Abcam). Para tumores de xenoinjerto se usaron anticuerpos conjugados fluorescentes primarios para CD45 de ratón (eBiosciences), CD31 de ratón (Biolegend, San Diego, CA) y clase I de HLA humano (Abcam) para seleccionar células cancerosas humanas vivas. Las células se suspendieron en 10 µg/ml de DAPI para marcar células muertas y se clasificaron en el sistema de clasificación de células FACSAria (BD Biosciences). Se inyectaron diferentes diluciones (10, 100 y 1.000 células clasificadas) de células clasificadas por HLA de cáncer de próstata humano (clase I de HLA-negativo y clase I de HLA-positivo) y células no clasificadas, y 100 células clasificadas por HLA de otras muestras de cáncer humano (inyecciones primarias) y xenoinjertos derivados (inyecciones secundarias) en ratones NOD/SCID. Se inyectaron cuatro ratones para cada población de células clasificadas y dilución celular. Se realizaron cuatro inyecciones en cada ratón para células clasificadas, dos en el flanco superior para células clase I de HLA-negativo y dos en el flanco inferior para células clase I de HLA-positivo. También se inyectaron células no clasificadas de cada espécimen tumoral en ratones NOD/SCID. Se realizaron inyecciones secundarias de células clasificadas por HLA de tumores generados a partir de células clasificadas clase I de HLA-negativo y los tumores raramente observados originados de la fracción de células clase I de HLA-positivo. La iniciación tumoral se midió por la incidencia tumoral (número de tumores/número de inyecciones) y la latencia (tiempo desde la inyección hasta la primera palpabilidad del tumor). La formación de tumores se evaluó regularmente por palpación de los sitios de inyección. En casos en los que un tumor fue palpable en solo un sitio de inyección, ese tumor se extirpó quirúrgicamente para permitir la evaluación continua de otros sitios de inyección. Los ratones se monitorizaron durante hasta 36 semanas. Los animales sin signo de carga tumoral también se examinaron en la autopsia para confirmar que no hubo desarrollo tumoral. Los tumores recogidos se fijaron en formalina, y se hicieron secciones en parafina para tinción H&E y estudios de inmunofluorescencia cuando fue necesario.

Efectos *in vitro* de inhibidores Notch y Hedgehog

[0140] Se analizaron los efectos *in vitro* de inhibidores Notch y Hedgehog sobre las líneas celulares clasificadas HLA-negativo y HLA-positivo por ensayos de ciclo celular y de formación de colonias (descritos anteriormente). Las células se expusieron a solución de vehículo (control), dexametasona (1 µM), ciclopamina (1 µM), Compuesto E (1 µM) y una combinación doble (por ejemplo, dexametasona más ciclopamina) o triple (dexametasona más ciclopamina más Compuesto E) de los fármacos.

Efectos de inhibidores Notch y Hedgehog en la iniciación tumoral

[0141] Para analizar si la inhibición de estas vías en desarrollo podría afectar la capacidad de iniciación tumoral de las células madre de cáncer *in vivo*, se inocularon 10³ células clasificadas HLA-negativo de líneas celulares y xenoinjertos de tumor de próstata humano por vía subcutánea en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con solución de vehículo (control), dexametasona (15 mg/kg/ip diariamente), ciclopamina (50 µg/kg/sc diariamente) más dexametasona, DBZ (10 µM/kg/ip diariamente) más dexametasona o una combinación de los 3 fármacos. La dexametasona y la ciclopamina se administraron continuamente; sin embargo, DBZ se administró diariamente (días 1 a 15 cada 4 semanas) con el fin de evitar la toxicidad intestinal. Para los estudios de las líneas celulares *in vivo*, se realizaron tres experimentos independientes en 8 ratones para el brazo de tratamiento (por ejemplo, ciclopamina), mientras que para los tumores de próstata humanos se incluyeron 8 ratones para cada brazo de tratamiento. Los ratones se monitorizaron cada día hasta que se formaron los tumores. Los animales se sacrificaron si mostraron cualquier evidencia de peligro o si perdieron más del 20 % de su peso corporal original. Los tumores generados se recogieron y se confirmaron histológicamente.

Caracterización del fenotipo quimiorresistente

[0142] Con respecto a los estudios de diferenciación, se evaluó la expresión de citoqueratinas (CK) como marcadores epiteliales, además de biomarcadores relacionados con la próstata, que incluyen AR, PSA y PSMA. Se ha informado previamente que las CK son específicas para células epiteliales diferenciadas humanas, desempeñando una función en el mantenimiento de la integridad celular, mientras que también funcionan en la transducción de señales y los procesos de diferenciación celular. Las CK de bajo peso molecular (por ejemplo, CK18, y CK19) se expresan específicamente en células de próstata humana normal luminal y cáncer de próstata, mientras que las CK de alto peso molecular (por ejemplo, CK5 y CK10) se identifican en células de próstata normal basal y raramente se observan en poblaciones de células cancerosas. En el modelo de la presente invención, las células resistentes a docetaxel mostraron una disminución significativa en tanto la transcripción génica como la expresión de proteínas de CK de bajo peso molecular. Las células DU145-DR mostraron una disminución de 6,25 y

16,6 veces en la expresión de proteínas de CK 19 y 18, respectivamente. Similarmente, 22RV1-DR mostró una disminución de 14,3 y 6,7 veces en tales CK cuando se cuantificaron y se compararon con las células parentales sensibles. La tinción por inmunofluorescencia de CK19 y CK18 confirmó su expresión reducida en las células resistentes a docetaxel (Figura 2). Además, las CK de alto peso molecular continuaron siendo indetectables en las células resistentes a docetaxel como en sus células parentales correspondientes (datos no mostrados), que indica que en el proceso de adquirir resistencia a docetaxel, las células pierden marcadores de diferenciación epitelial y no experimentan un desplazamiento de un fenotipo luminal (CK de bajo peso molecular) a uno similar a basal (CK de alto peso molecular). Además, las células 22RV1, que expresan marcadores de diferenciación relacionados con la próstata que incluyen AR, PSMA y PSA, mostraron una espectacular disminución de los niveles de expresión de genes y de proteínas de tales marcadores cuando se expusieron a docetaxel (Figura 2). Las células 22RV1-DR mostraron una disminución de 16,6, 20,0 y 11,1 veces en la expresión de proteínas de AR, PSMA y PSA, respectivamente. Estos resultados se confirmaron adicionalmente por análisis de inmunofluorescencia (datos no mostrados).

[0143] Con respecto a los mecanismos de inmuno-evasión, se encontró que las células resistentes a docetaxel mostraron desregulación de moléculas de la clase I del MHC. En este contexto, trabajo previo del grupo de los presentes inventores ya informó de la identificación de subpoblaciones de células tumorales negativas para antígenos de la clase I del MHC en carcinomas primarios y metastásicos humanos (Cordon-Cardo, *et al.*, 1991). En el presente estudio, se encontró que los antígenos de la clase I del MHC, que son críticos para la eficaz presentación de antígenos a linfocitos T citotóxicos y posterior lisis de células tumorales, se regularon por disminución a tanto nivel de transcripción génica como de proteína (Figura 2). La pauta de expresión génica reveló una regulación por disminución significativa en todos los antígenos de la clase I del MHC (A, B, C, E, F, G), un hecho que se confirmó al nivel de proteína por inmunotransferencia y tinción por inmunofluorescencia de los antígenos de la clase I del MHC A, B, C (Figura 2). Además, las células resistentes a docetaxel mostraron una regulación por disminución en los niveles de transcrito de genes de ligandos NK conocidos, tales como MICA/B, PVR y PVRL2, como se muestra en la Tabla 9. Así, estas células presentan un fenotipo que favorece la inmuno-evasión, haciéndolas indetectables por el sistema inmunitario del huésped.

[0144] La expresión génica de ligandos citolíticos naturales (NK) que se desregularon en células resistentes a docetaxel (DU145-DR y 22RV1-DR) cuando se compararon con sus células parentales sensibles (DU145 y 22RV1) se resume en la Tabla 9. El análisis estadístico de la diferencia promedio de la expresión media de genes, que muestra un cambio ≥ 2 veces basado en una normalización logarítmica, se hizo usando una prueba de la t entre células sensibles y resistentes emparejadas. Hay una disminución en los niveles de transcripción de la mayoría de los genes de ligandos NK.

TABLA 9

Niveles de transcripción génica de ligandos de linfocitos citolíticos naturales (NK).

Nombre del gen	Cambio de x veces de DU145/DR; 22RV1/DR	valor de p
Secuencia A relacionada con el polipéptido de la clase I de MHC	-1,4; -1,7	NS; NS
Secuencia A///B relacionada con el polipéptido de la clase I de MHC	-2,2; -1,8	<0,05; NS
Secuencia B relacionada con el polipéptido de la clase I de MHC	-2,2; -1,5	<0,05; NS
Receptor del virus de la polio	-4,1; -2,1	<0,0001; <0,05
2 relacionado con el receptor del virus de la polio (mediador B de la entrada del virus del herpes)	-2,5; -1,7	<0,05; NS

Nota: NS=No significativo

[0145] Con respecto a los estudios sobre el fenotipo de células madre, se caracterizó la expresión desregulada identificada de WNT/ β -catenina, Notch y Hedgehog, que participan en la autorrenovación y diferenciación de células progenitoras (Kato *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2006; van den Brink *et al.*, 2004; Radtke *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2008; y Grigoryan *et al.*, 2008). En la próstata, estas vías de señalización desempeñan funciones esenciales en la pauta de desarrollo, la regeneración epitelial y la tumorigénesis de cáncer de próstata (Wang *et al.*, 2006, Karhadkar *et al.*, 2004). Las células resistentes a docetaxel mostraron una disminución significativa en tanto los niveles de transcrito de genes como de proteína de Dickkopf-1 (DKK1), un inhibidor muy conocido de la red de señalización de WNT/ β -catenina. Esta disminución en la expresión de DKK1 se asoció a un aumento en la expresión de β -catenina desfosforilada (activa), que es el principal efector clave de la señalización de WNT. El análisis de inmunofluorescencia demostró que las células sensibles a docetaxel parentales presentaron una expresión membranosa de β -catenina, asociada a su función como molécula de adhesión, mientras que las células resistentes a docetaxel mostraron una pronunciada localización nuclear de esta proteína (Figura 2), informada como necesaria para la activación de la vía de señalización canónica de WNT. Además, las células resistentes a docetaxel también presentaron un aumento en la red de señalización de NOTCH. Los niveles de transcrito de genes NOTCH2 aumentaron significativamente en las células resistentes y se asociaron a un aumento en la expresión de proteínas Notch2 escindidas que se asoció a translocalización nuclear de la proteína, donde ejerce su actividad transcripcional (Figura 2). Finalmente, las células resistentes a docetaxel tuvieron una elevada expresión del receptor Hedgehog

Patched y los factores de transcripción de homólogo de oncogén asociado a glioma, Gli1 y Gli2. Estos hallazgos se asociaron a un aumento de la expresión de proteínas y translocalización nuclear de los factores de transcripción anteriormente mencionados (Figura 2), una condición que se ha relacionado con la activación de la vía de Hedgehog. Sorprendentemente, no se encontró que otros marcadores superficiales de células madre informados, tales como CD44 y CD133, se regularan por incremento en el modelo, como se analiza tanto a los niveles de transcrito de gen como de proteína (datos no mostrados).

[0146] Además, se observó que la reversibilidad del fenómeno resistente para tanto células DU145-DR como 22RV1-DR se asoció a un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación. Las células resistentes invertidas a docetaxel (cultivadas sin el fármaco durante 12 semanas) mostraron mayores niveles de expresión de proteínas de citoqueratinas de bajo peso molecular (CK19 y CK18) y clase I de HLA cuando se compararon con células con resistencia adquirida a docetaxel, alcanzando niveles similares a aquellos observados en células parentales sensibles (Figura 13).

15 Generación y caracterización de un modelo indicador de diferenciación epitelial

[0147] Se transfectaron establemente células parentales DU145 con un plásmido que contenía un promotor de CK19 que conducía la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 14a). La co-expresión de CK19 y GFP en células estables DU145-promotor de CK19-GFP se confirmó por inmunofluorescencia (Figura 14a). La cuantificación por citometría de flujo mostró dos poblaciones de células distintas siendo la mayoría de las células positivas para tanto GFP como CK19 ($94,3 \pm 3,8\%$) y una población de células discreta negativa para ambos marcadores ($5,6 \pm 4,1\%$). Se observaron algunas células dispersas fuera de estas dos poblaciones principales que podrían representar células de tránsito de un compartimento al otro. Además, la inserción estable de una construcción de promotor en células CK19/GFP negativo se confirmó por PCR (Figura 4c). La expresión de la clase I de HLA en células estables DU145-promotor de CK19-GFP se caracterizó adicionalmente (Figura 14b). No sorprendentemente, las células que expresaron GFP también fueron HLA-positivo ($91,6 \pm 5,5\%$) y las células que no expresaron GFP presentaron un fenotipo HLA-negativo ($7,0 \pm 4,95$). Así, estos resultados validan el uso de GFP como indicador de la diferenciación epitelial y adicionalmente demuestran, como se muestra previamente en la Figura 4b, la existencia de una subpoblación de células que carece de marcadores de diferenciación (CK19/GFP) y antígenos de la clase I de HLA.

Estudios de iniciación tumoral en líneas celulares clasificadas de la clase I de HLA

[0148] Con el fin de confirmar adicionalmente que la expresión de la clase I de HLA puede usarse como marcador superficial de células que identifica células con la propiedad funcional de células madre de cáncer de iniciación tumoral, las líneas celulares parentales DU145 y 22RV1 se clasificaron para la clase I de HLA y su capacidad de iniciación tumoral se probó en ratones NOD/SCID (Figura 15). Similar a los resultados obtenidos con las células GFP-negativo estables DU145-promotor de CK19-GFP, solo las células clase I de HLA-negativo presentaron capacidad de iniciación tumoral después de los ensayos de dilución. La inyección de 10 células clase I de HLA-negativo DU145 y 22RV1 produjo tumores en el $83,3 \pm 19,1\%$ y el 100% de los receptores, respectivamente, mientras que no se observó formación tumoral después de 198 días de inyección con 10 células que presentan un fenotipo clase I de HLA-positivo. De importancia, la capacidad de iniciación tumoral y las latencias tumorales de células clase I de HLA-negativo de 22RV1 y DU145 fueron diferentes, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Las diferencias entre líneas celulares tumorigénicas podrían explicarse por el hecho de que otras vías moleculares pueden desempeñar una función en el injerto y crecimiento de células humanas en ratones. Se obtuvieron resultados similares después del trasplante en serie de xenoinjertos de tumor generados clase I de HLA-negativo (datos no mostrados).

Estudios de clonabilidad en líneas celulares clasificadas por clase I de HLA

[0149] Con el fin de tratar la capacidad de clonabilidad de células clasificadas por la clase I de HLA de líneas celulares parentales DU145 y 22RV1, se realizaron ensayos de formación de colonias por dilución. Células clase I de HLA-negativo presentaron una clonabilidad mayor estadísticamente significativa que las células clase I de HLA-positivo. Específicamente, las células clasificadas clase I de HLA-negativo de DU145 generaron colonias en el $31,6 \pm 7,5\%$, $17,1 \pm 3,6\%$ y $22,0 \pm 4,9\%$ cuando se sembraron 10, 100 y 1000 células, respectivamente. A diferencia, las células clase I de HLA-positivo generaron colonias en el $5,0 \pm 8,3\%$, $8,0 \pm 3,3\%$ y $5,5 \pm 1,5\%$ cuando se sembraron 10, 100 y 1000 células (Figura 8). Se observaron resultados similares con células parentales clasificadas por clase I de HLA 22RV1 (datos no mostrados).

60 Identificación de células madre de cáncer de próstata en tejidos humanos

[0150] Estudios inmunohistoquímicos de tejidos de cáncer de próstata humano con metástasis ($n=20$) y primarios ($n=6$) emparejados revelaron que todos los especímenes contuvieron subpoblaciones dispersas de células tumorales CK-negativo (CK18 y CK19), representando del $0,05\%$ al $0,3\%$ y del $0,4\%$ al $1,8\%$ de todas las células tumorales en lesiones primarias y metastásicas, respectivamente (Figura 7a). Entonces se realizó tinción doble basada en inmunofluorescencia para evaluar la asociación entre la expresión de CK y los marcadores de interés. En

este análisis, se observó coherentemente que la expresión de CK estaba significativamente asociada a la expresión de la clase I de HLA ($p < 0,0001$). Más específicamente, se observó que la población tumoral CK-negativa no expresó antígenos de la clase I de HLA en el $97,8 \pm 0,7$ % de las células, mientras que todas (100 %) las células CK-positivo presentaron un fenotipo positivo para antígeno de la clase I de HLA (Figura 4b). Se identificó una pequeña población de células CK-negativa que presentaron un fenotipo clase I de HLA-positivo, que podría representar células tumorales que expresaron transición de un fenotipo clase I de HLA-negativo/CK-negativo a un fenotipo diferenciado. Además, se encontró coherentemente que las células tumorales CK-negativo/HLA-negativo tenían un aumento significativo ($p < 0,0001$) de la expresión nuclear (activación) de factores de transcripción en desarrollo cuando se compararon con células CK-positivo/HLA-positivo diferenciadas. Las células CK-negativo/HLA-negativo presentaron expresión nuclear de β -catenina desfosforilada en el $63,9 \pm 22,6$ % de las células, Notch2 escindido en el $72,8 \pm 15,1$ %, Gli1 en el $67,5 \pm 17,3$ % y Gli2 en el $67 \pm 17,3$ %, mientras que las células CK-positivo/HLA-positivo expresaron β -catenina desfosforilada nuclear en solo el $5,8 \pm 11,9$ % de las células, Notch2 escindido en el $6,7 \pm 7,9$ %, Gli1 en el $1,2 \pm 7,9$ % y Gli2 en el $1,5 \pm 10,6$ % (Figura 7c). Además, también se observó que las células tumorales CK-negativo/clase I de HLA-negativo no mostraron expresión de AR nuclear, mientras que las células CK-positivo/HLA-positivo presentaron AR nuclear en el $71,8 \pm 14,3$ % de las células (Figura 7d). Así, el hecho de que las células madre de cáncer de próstata no muestren un fenotipo AR positivo sugiere que estas células pueden no ser dependientes de una señalización de AR funcional, que explicaría cómo estas células podrían ser responsables de la recaída observada después de la terapia hormonal. Tomados conjuntamente, estos resultados confirman su existencia y la capacidad para identificar una subpoblación de células madre de cáncer de próstata en muestras de tejido de cáncer de próstata humano.

Análisis estadísticos

[0151] Los datos experimentales se expresan como media \pm DE. Se realizó el análisis estadístico por prueba de la t de Student. Los valores se consideraron estadísticamente significativos a $p < 0,05$.

EJEMPLO 6

ENSAYO DE ALTO RENDIMIENTO *IN VITRO*

[0152] Basándose en la quimiorresistencia funcional y en las características fenotípicas de las CSC desveladas anteriormente, se diseñó un ensayo de alto rendimiento *in vitro* para cribar compuestos que se dirigen a esta población de CSC, y para determinar si las CSC se destruían o se diferenciaban selectivamente. La implementación de este ensayo permite probar una amplia variedad de fármacos y facilita la identificación de compuestos con un supuesto efecto inhibitorio de CSC.

[0153] El ensayo de alto rendimiento *in vitro* consiste en la siembra de las CSC anteriormente mencionadas en placas de 96 pocillos. Las células se exponen entonces a los agentes candidatos, por ejemplo, fármacos, de interés, y se obtienen lecturas en momentos de tiempo deseados (por ejemplo, 24 horas, 72 horas, etc.). Las lecturas consisten en comparar el porcentaje de células que expresan el fenotipo de CSC (por ejemplo, carecen de HLA, CD24, etc.) en poblaciones tratadas frente a no tratadas por análisis de citometría de flujo. En paralelo, también se realizan ensayos de viabilidad celular, que comparan el porcentaje de células viables ("que sobreviven") entre células tratadas y sin tratar. Los resultados se interpretan del siguiente modo: agentes candidatos, por ejemplo, fármacos, que se dirigen a la población de CSC deben inhibir el crecimiento o destruir células quimiorresistentes que carecen de CSC. Pueden obtenerse cuatro posibles resultados con este ensayo: resultado 1, una disminución en el porcentaje de CSC con una disminución en la viabilidad celular; resultado 2, una disminución en CSC sin una disminución en la viabilidad celular; resultado 3, un aumento en poblaciones de CSC con una disminución en la viabilidad celular; y resultado 4, ninguna disminución en ni el porcentaje de CSC ni en la viabilidad celular. El resultado 1 puede interpretarse que la población de CSC ha sido elegida como diana por el agente candidato, por ejemplo, el fármaco. El resultado 2 puede interpretarse que la población de CSC se ha diferenciado. El resultado 3 puede interpretarse que las células neoplásicas, pero no la población de CSC, ha sido elegida como diana por el agente candidato, por ejemplo, el fármaco. El resultado 4 puede interpretarse que no se produce efecto por el agente candidato, por ejemplo, fármaco, ni en CSC ni en células diferenciadas neoplásicas.

[0154] Los agentes candidatos, por ejemplo, fármacos que producen la disminución de CSC (resultado 1) o la diferenciación de CSC (resultado 2) se considerarían para experimentación y caracterización adicional por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo* estándar. Brevemente, estos ensayos que pretenden confirmar y validar resultados de cribado previos incluyen: a) *in vitro* - métodos apoptóticos (por ejemplo, anexina V), formación de colonias y estudios de diferenciación basados en sus fenotipos correspondientes (por ejemplo, citometría de flujo y análisis inmunohistoquímicos); y b) *in vivo* - ensayos de iniciación tumoral por dilución en ratones inmunodeprimidos.

[0155] Este cribado de alto rendimiento se valida usando los inhibidores Notch y Hedgehog desvelados anteriormente.

[0156] Aunque se han descrito realizaciones ilustrativas de la presente invención en el presente documento, debe entenderse que la invención no se limita a aquellas descritas.

Documentos citados

[0157]

- 5 1. Al-Hajj, M., et al., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 3983-3988 (2003).
2. Ali, T. Z. et al., False positive labeling of prostate cancer with high molecular weight cytokeratin: p63 a more specific immunomarker for basal cells. *Am J Surg Pathol* 32, 1890-1895 (2008).
- 10 3. Alix-Panabieres, C. et al., Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 11 (3):R39 (2009).
4. Alison, M. R. et al., Number crunching in the cancer stem cell market. *Breast Cancer Res.* 11(2):302 (2009).
- 15 5. Bao, S. et al., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760 (2006).
6. Brulet, P. et al., Monoclonal antibodies against trophectoderm-specific markers during mouse blastocyst formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4113-4117 (1980).
- 20 7. Cariati, M. et al., Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer* 122, 298-304 (2008).
- 25 8. Chen, J. K. et al., Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 16, 2743-2748, (2002).
9. Chen, R. et al., A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362-375 (2009).
- 30 10. Collins, A. T. et al., Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946-10951 (2005).
11. Cordon-Cardo, C. et al., Expression of HLA-A,B,C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Cancer Res* 51, 6372-6380 (1991).
- 35 12. Costello, R. T. et al., Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* 60, 4403-4411 (2000).
- 40 13. Dalerba, P. et al., Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58, 267-284 (2007).
14. Dean, M. et al., Tumor stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5, 275-284 (2005).
- 45 15. Desoye, G. et al., Lack of HLA class I and class II antigens on human preimplantation embryos. *J Immunol* 140, 4157-4159 (1988).
16. Fedi, P. et al., Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J Biol Chem* 274, 19465-19472 (1999).
- 50 17. Fillmore, C. M. et al., Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 10, R25 (2008).
18. Grigoryan, T. et al., Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 22, 2308-2341 (2008).
- 55 19. Gunaratne, P. H., Embryonic stem cell microRNAs: defining factors in induced pluripotent (iPS) and cancer (CSC) stem cells? *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 4(3):168-177 (2009).
- 60 20. Gupta, P. B. et al., Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138, 645-659 (2009).
21. Guzman, M. L. et al., Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99,16220-16225 (2002).
- 65 22. Jordan, C. T. et al., Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355, 1253-1261 (2006).

23. Karhadkar, S. S. et al., Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431, 707-712 (2004).
- 5 24. Katoh, M., Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev* 3, 30-38 (2007).
25. Leong, K. G. et al., The Notch pathway in prostate development and cancer. *Differentiation* 76, 699-716 (2008).
- 10 26. Li, H. et al., PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res* 68, 1820-1825 (2008).
27. Lu, H. et al., Type II keratins precede type I keratins during early embryonic development. *Eur J Cell Biol* 84, 709-718 (2005).
- 15 28. McDonald, S. A. et al., Clonal expansion in the human gut: mitochondrial DNA mutations show us the way. *Cell Cycle* 5, 808-811 (2006).
29. Nishii, T. et al., Cancer stem cell-like SP cells have a high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma. *Cancer Sci.* 100(8):1397-1402 (2009).
- 20 30. O'Brien, C. A. et al., A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110 (2007).
- 25 31. Oshima, R. G., Identification and immunoprecipitation of cytoskeletal proteins from murine extra-embryonic endodermal cells. *J Biol Chem* 256, 8124-8133 (1981).
32. Patrawala, L. et al., Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25, 1696-1708 (2006).
- 30 33. Patrawala, L. et al., Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+alpha2beta1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells. *Cancer Res* 67, 6796-6805 (2007).
34. Petersen, O. W., et al., Epithelial progenitor cell lines as models of normal breast morphogenesis and neoplasia. *Cell Prolif.* 36 Suppl. 1:33-44 (2003).
- 35 35. Petrylak, D. P. et al., Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 351, 1513-1520 (2004).
- 40 36. Petrylak, D. P. et al., P-glycoprotein expression in primary and metastatic transitional cell carcinoma of the bladder. *Ann Oncol* 5, 835-840 (1994).
37. Ponti, D. et al., Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65, 5506-5511 (2005).
- 45 38. Quintana, E. et al., Efficient tumor formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593-598 (2008).
39. Radtke, F. et al., From gut homeostasis to cancer. *Curr Mol Med* 6, 275-289 (2006).
- 50 40. Rahman, R. et al., Cellular immortality in brain tumours: an integration of the cancer stem cell paradigm. *1792(4):280-288* (2009).
41. Real, P. J. et al., Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 15, 50-58, (2009).
- 55 42. Reya, T. et al., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111 (2001).
43. Ricci-Vitiani, L. et al., Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115 (2007).
- 60 44. Ricci-Vitiani, L. et al., Colon cancer stem cells. *J. Mol. Med.* 87(11):1097-1104 (2009).
45. Rosen, J. M. et al., The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670-1673 (2009).
- 65

46. Sanchez-Carbayo, M. et al., Expression profiling of osteosarcoma cells transfected with MDR1 and NEO genes: regulation of cell adhesion, apoptosis, and tumor suppression-related genes. *Lab Invest* 83, 507-517 (2003).
- 5 47. Seiffert, D. et al., Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *J Biol Chem* 275, 34086-34091, (2000).
48. Sharma, S. V. et al., A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141, 69-80 (2010)
- 10 49. Shmelkov, S. V. et al., CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118, 2111-2120 (2008).
- 15 50. Singh, S. K. et al., Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* 432, 396-401 (2004).
51. Takaishi, S. et al., Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 27(5):1006-1020 (2009).
- 20 52. Taipale, J. et al., Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 406, 1005-1009, (2000).
53. Tannock, I. F. et al., Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351, 1502-1512 (2004).
- 25 54. Tesar, P. J. et al., New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196-199 (2007).
55. van den Brink, G. R. et al., Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet* 36,277-282 (2004).
- 30 56. Tripathi, M. K. et al., Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 508-515 (2005)
- 35 57. Trumpp, A. et al., Mechanisms of Disease: cancer stem cells--targeting the evil twin. *Nat Clin Pract Oncol* 5, 337-347 (2008).
58. van Es, J. H. et al., Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959-963, (2005).
- 40 59. Vermeulen, L. et al., Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ* 15, 947-958 (2008).
60. Wang, X. D. et al., Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol* 290, 66-80 (2006).
- 45 61. Willert, K. et al., Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20, 1394-1404 (2006).
62. Wu, M. et al., Imaging hematopoietic precursor division in real time. *Cell Stem Cell* (2007).

Listado de secuencias

- 50 **[0158]**
- <110> The Trustees of Columbia Universidad in the City of New York
Cordon-Cardo, Carlos
- 55 <120> ENSAYO PARA CRIBAR COMPUESTOS QUE DISMINUYEN SELECTIVAMENTE EL NÚMERO DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER
- <130> IC035795/0311192
- 60 <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.3
- 65 <210> 1
<211> 21

ES 2 586 599 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> construcción sintética; cebador directo del promotor de CK19

<400> 1
aacgcatgct ttgggggat g 21

10 <210> 2
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> construcción sintética; cebador inverso del promotor de CK19

<400> 2
tccccctta ctggcccc ac 22

20 <210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> construcción artificial; cebador directo de la región codificante de GFP

<400> 3
ttctgcgtt atcccctgat tc 22

30 <210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> construcción sintética; cebador inverso de la región codificante de GFP

40 <400> 4
gctcctccgg cccttgctca cca 24

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un agente que disminuye selectivamente el número de células madre de cáncer (CSC) que comprende:
- 5 a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato; y b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento de la CSC o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato; en el que la CSC es una célula cancerosa que es HLA⁻.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que la CSC tiene adicionalmente al menos una de las siguientes propiedades: CD24⁻, CD133⁻, Notch⁺, Gli1⁺, Gli2⁺, citoqueratina-, Neurofil⁻ y proteína ácida fibrilar glial⁻ (GFAP-).
- 15 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la CSC tiene adicionalmente al menos una de las siguientes propiedades: capacidad de autorrenovación, experimenta división celular asimétrica, tiene capacidad tumorigénica, tiene potencial metastásico, tiene propiedades multidiferenciación, amplía quimiorresistencia y sensibilidad a inhibidores Notch y Hedgehog.
- 20 4. El método según la reivindicación 1, en el que las CSC son resistentes a quimioterapia convencional.
5. El método según la reivindicación 1, en el que el agente candidato está seleccionado del grupo que consiste en un producto químico, un producto biológico, y combinaciones de los mismos.
- 25 6. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinar comprende además comparar el porcentaje de CSC en una población de células que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células que no se trata con el agente candidato, en el que un agente candidato que disminuye el porcentaje de CSC en la población de células tratadas en comparación con el porcentaje de CSC en las células sin tratar, es un agente que disminuye selectivamente el número de CSC.
- 30 7. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinar comprende llevar a cabo un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en un análisis de citometría de flujo, un ensayo de viabilidad celular, un ensayo de diferenciación celular, un ensayo de división celular, y combinaciones de los mismos.
- 35 8. El método según la reivindicación 1, en el que la población de células comprende CSC y células madre adultas y el agente disminuye el número de CSC en la población de células sin disminuir sustancialmente el número de células madre adultas.
9. El método según la reivindicación 1, que es un cribado de alto rendimiento.
- 40 10. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinar comprende además la etapa i y al menos una de las etapas ii, iii, y iv: i. comparar el porcentaje de CSC en una población de células, que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células, que no se trata con el agente candidato;
- 45 ii. determinar el porcentaje de células viables en la población de células tratadas y no tratadas,
iii. determinar el porcentaje de células no CSC en la población de células tratadas y no tratadas; y
iv. determinar el porcentaje de células en división en la población de células tratadas y no tratadas,
- 50 en el que un agente candidato que (1) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la viabilidad celular; (2) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la viabilidad celular; (3) disminuye el porcentaje de CSC y aumenta el porcentaje de no CSC; (4) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la división celular; o (5) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la división celular es un agente que disminuye selectivamente el número de CSC.
- 55 11. El método según la reivindicación 10, en el que la etapa de determinar comprende llevar a cabo un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en análisis de citometría de flujo, un ensayo de viabilidad celular, un ensayo de diferenciación celular, un ensayo de división celular, y combinaciones de los mismos.
- 60 12. Un método de cribado de alto rendimiento para identificar agentes que disminuyen selectivamente el porcentaje de células madre de cáncer (CSC) en una población de células que comprende:
- a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato;
b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato:
- 65 i. comparando el porcentaje de CSC en una población de células que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células que no se trata con el agente candidato;

- ii. determinando el porcentaje de células viables en la población de células tratadas y no tratadas;
- iii. determinando el porcentaje de células no CSC en la población de células tratadas y no tratadas; y
- iv. determinando el porcentaje de células en división en la población de células tratadas y no tratadas;

5 en el que un agente candidato que (1) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la viabilidad celular; (2) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la viabilidad celular; (3) disminuye el porcentaje de CSC y aumenta el porcentaje de no CSC; (4) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la división celular; o (5) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la división celular es un agente que disminuye selectivamente el porcentaje de CSC; en el que la CSC es una célula cancerosa que es HLA⁻.

10 **13.** El método según la reivindicación 12, en el que la CSC tiene adicionalmente al menos una de las siguientes propiedades: CD24⁻, CD133⁻, Notch⁺, Gli1⁺, Gli2⁺, citoqueratina⁻, Neurofil⁻ y GFAP⁻.

15 **14.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en el que la CSC tiene adicionalmente al menos una de las siguientes propiedades: capacidad de autorrenovación, experimenta división celular asimétrica, tiene capacidad tumorigénica, tiene potencial metastásico, tiene propiedades multi-diferenciación, amplía quimiorresistencia y sensibilidad a inhibidores Notch y Hedgehog.

20 **15.** El método según la reivindicación 12, en el que la etapa (i) se lleva a cabo por análisis de citometría de flujo.

16. El método según la reivindicación 12, en el que la etapa (ii) se lleva a cabo por un ensayo de viabilidad celular.

17. El método según la reivindicación 12, en el que la etapa (iii) se lleva a cabo por un ensayo de diferenciación celular.

25 **18.** El método según la reivindicación 12, en el que la etapa (iv) se lleva a cabo por un ensayo de división celular.

19. El método según la reivindicación 12, en el que el agente candidato está seleccionado del grupo que consiste en un producto químico, un producto biológico, y combinaciones de los mismos.

30 **20.** El método según la reivindicación 12, en el que las CSC son resistentes a quimioterapia convencional.

21. Un método de cribado de alto rendimiento para identificar agentes que disminuyen selectivamente el porcentaje de células madre de cáncer (CSC) en una población de células, en el que las CSC son resistentes a quimioterapia convencional, que comprende:

40 a. poner en contacto una CSC de una población de células con un agente candidato, en el que la CSC tiene las siguientes propiedades: HLA I⁺ y HLA II⁻;

b. determinar si el agente candidato reduce o no la supervivencia o crecimiento o aumenta la diferenciación de la CSC con respecto a una CSC que no se ha puesto en contacto con el agente candidato:

45 i. comparando, usando citometría de flujo, el porcentaje de CSC en la población de células, que se trata con el agente candidato, con el porcentaje de CSC en una población de células, que no se trata con el agente candidato;

ii. determinando, usando un ensayo de viabilidad celular, el porcentaje de células viables en la población de células tratadas y no tratadas;

iii. determinando, usando un ensayo de diferenciación celular, el porcentaje de células no CSC en la población de células tratadas y no tratadas; y

50 iv. determinando, usando un ensayo de división celular, el porcentaje de células en división en la población de células tratadas y no tratadas;

en el que un agente candidato que (1) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la viabilidad celular; (2) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la viabilidad celular; (3) disminuye el porcentaje de CSC y aumenta el porcentaje de no CSC; (4) disminuye el porcentaje de CSC y disminuye la división celular; o (5) disminuye el porcentaje de CSC sin una disminución en la división celular es un agente que disminuye selectivamente el porcentaje de CSC.

55 **22.** El método según la reivindicación 21, en el que el agente candidato está seleccionado del grupo que consiste en un producto químico, un producto biológico, y combinaciones de los mismos.

60

Figura 1a

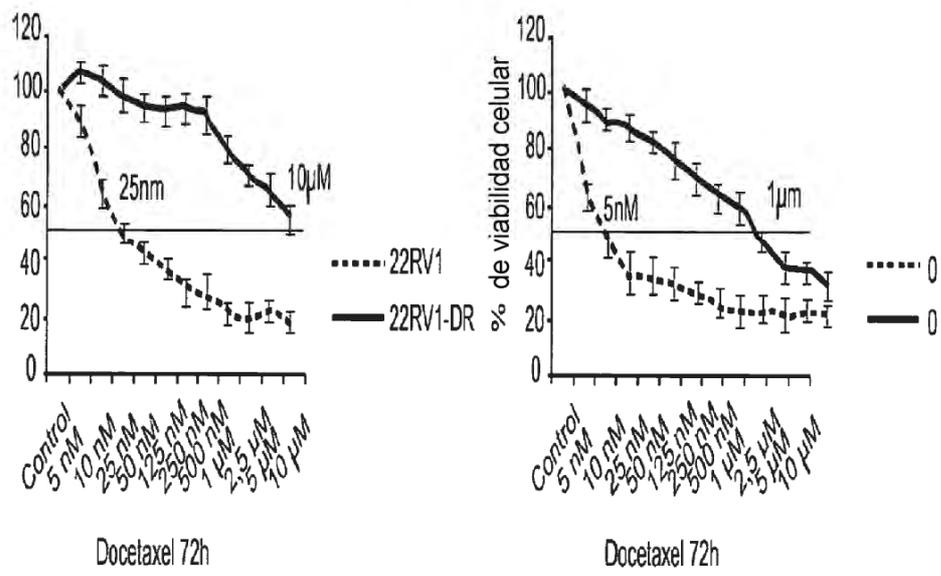


Figura 1b

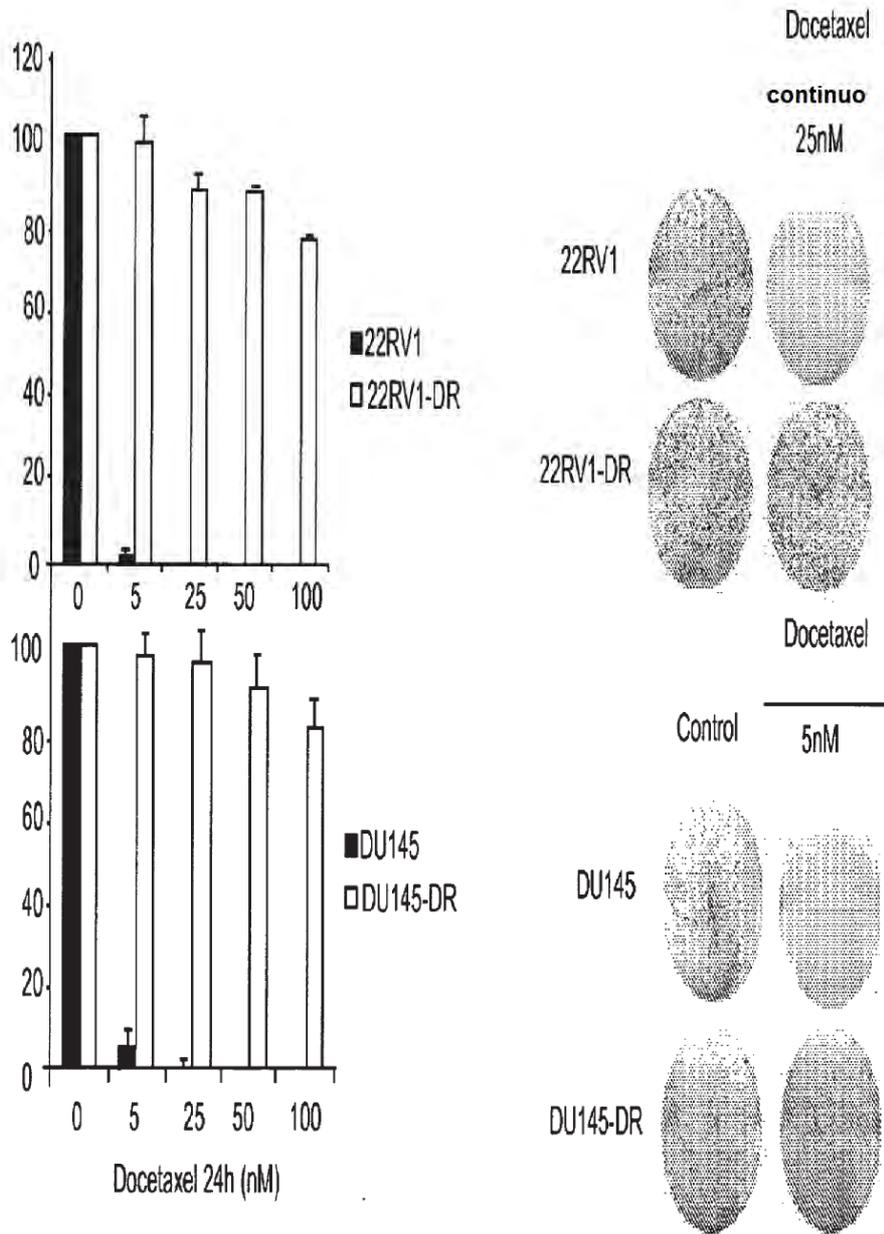


Figura 1c

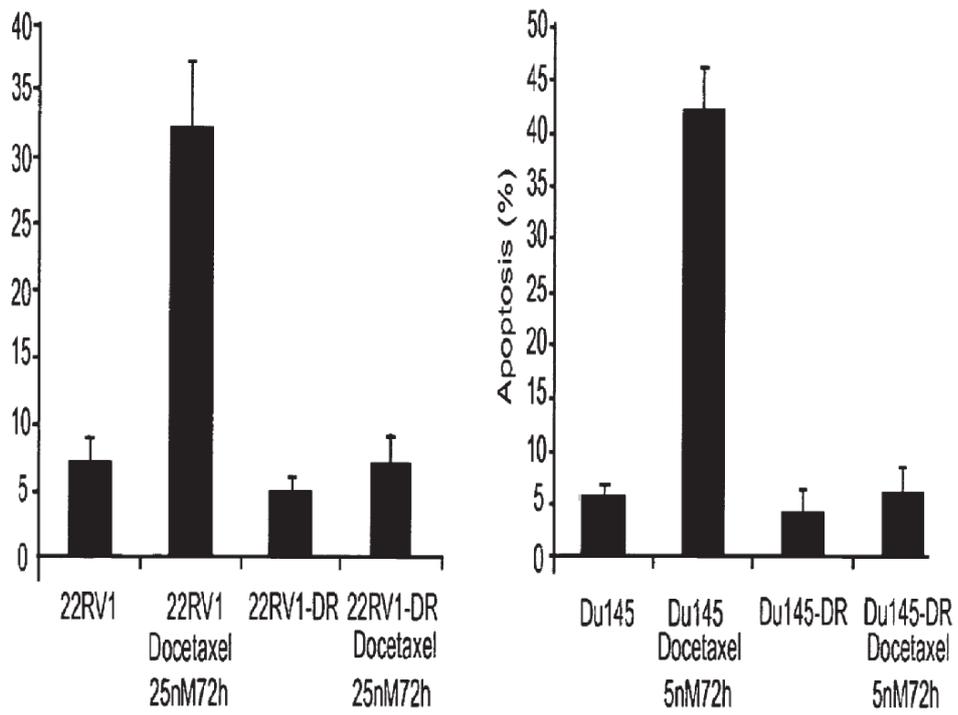


Figura 1d

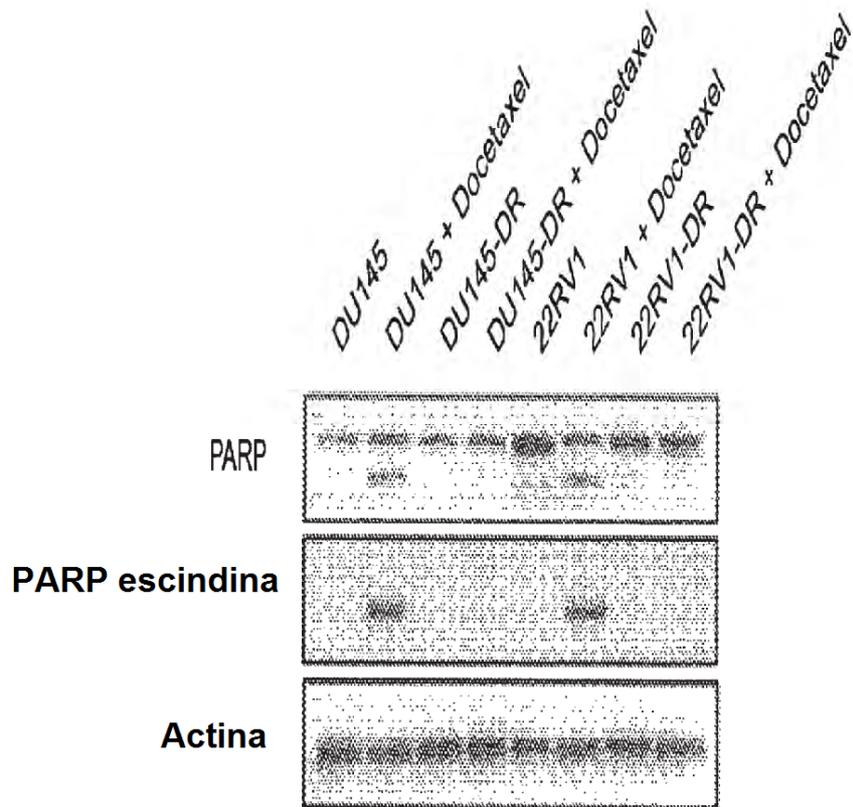


Figura 2a izquierda

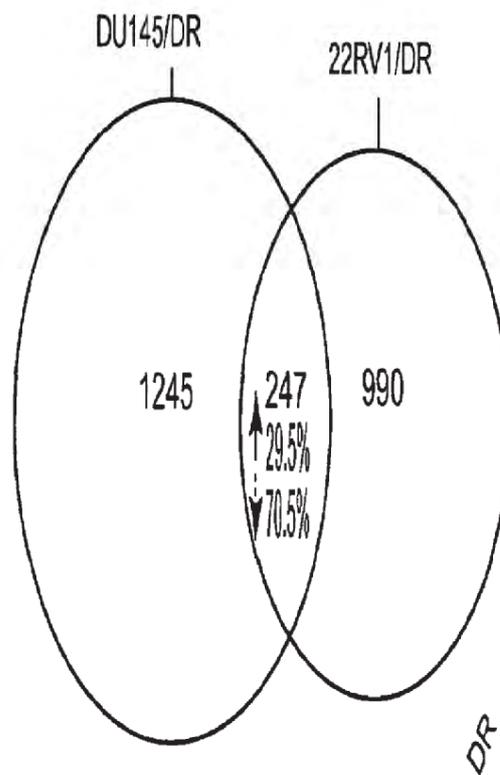


Figura 2a derecha

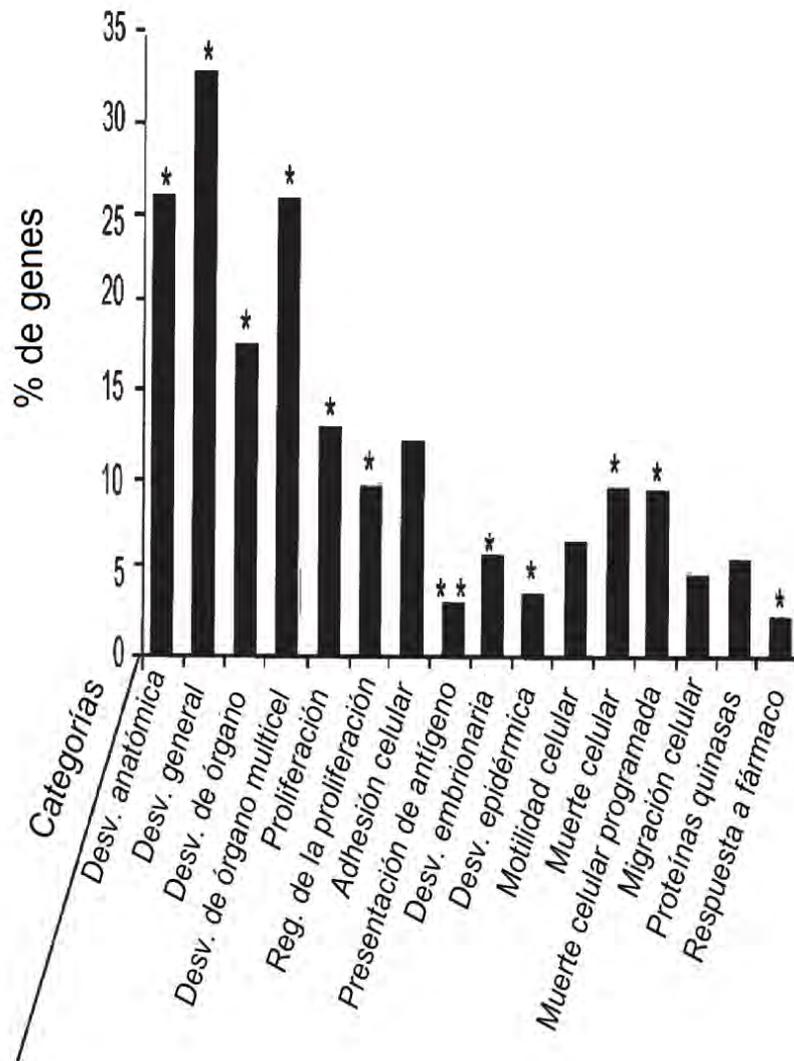


Figura 2b

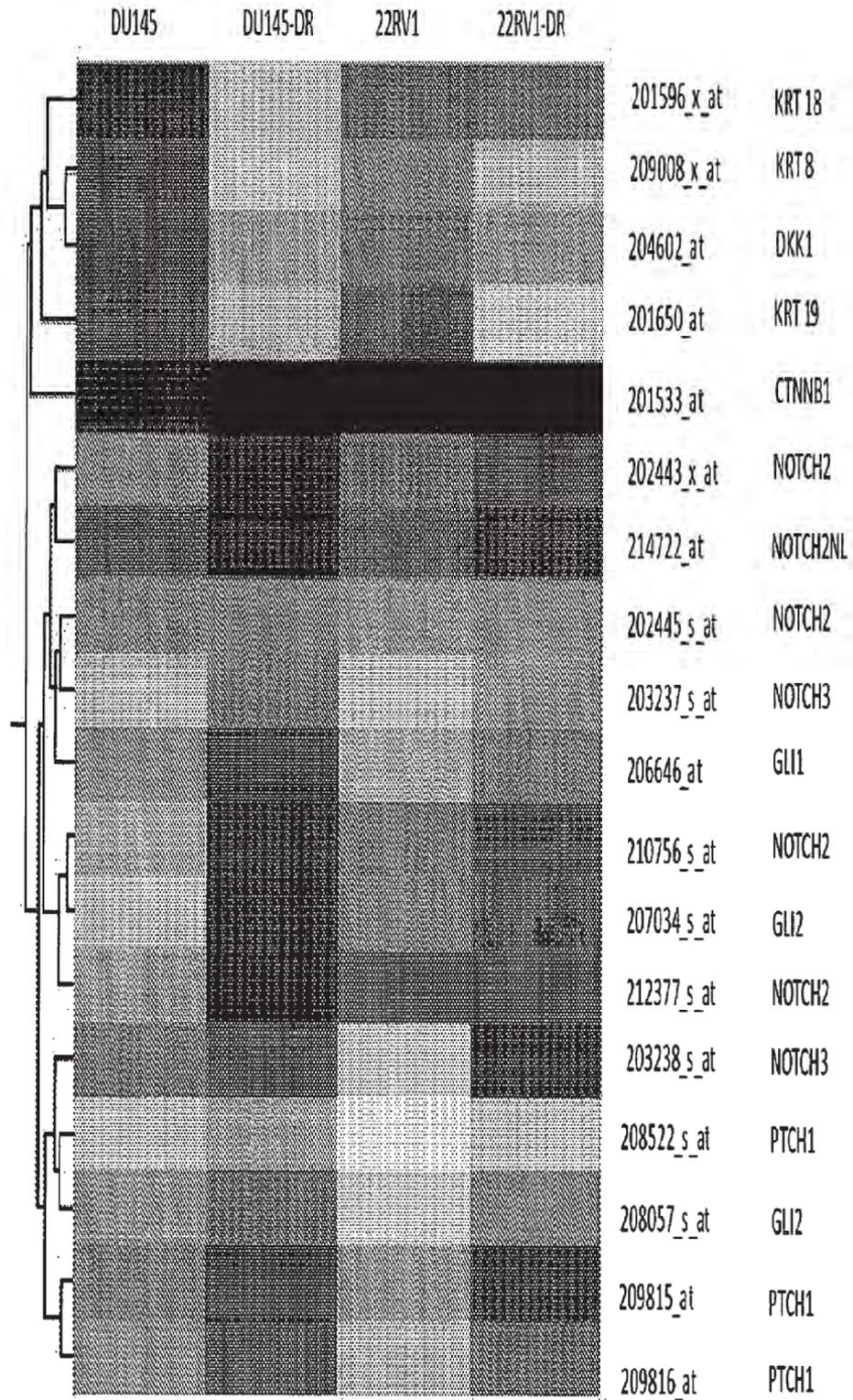


Figura 2c

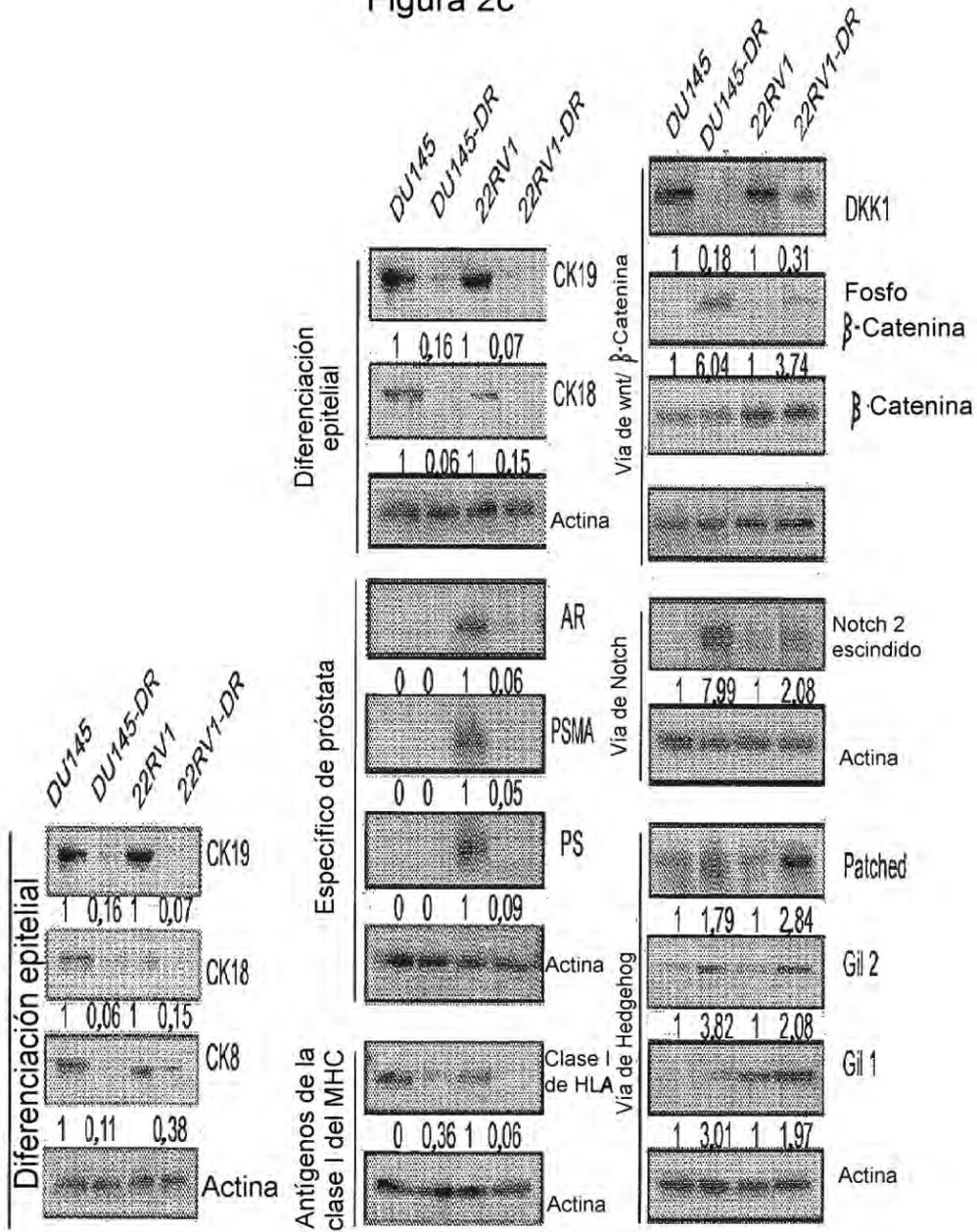


Figura 2d

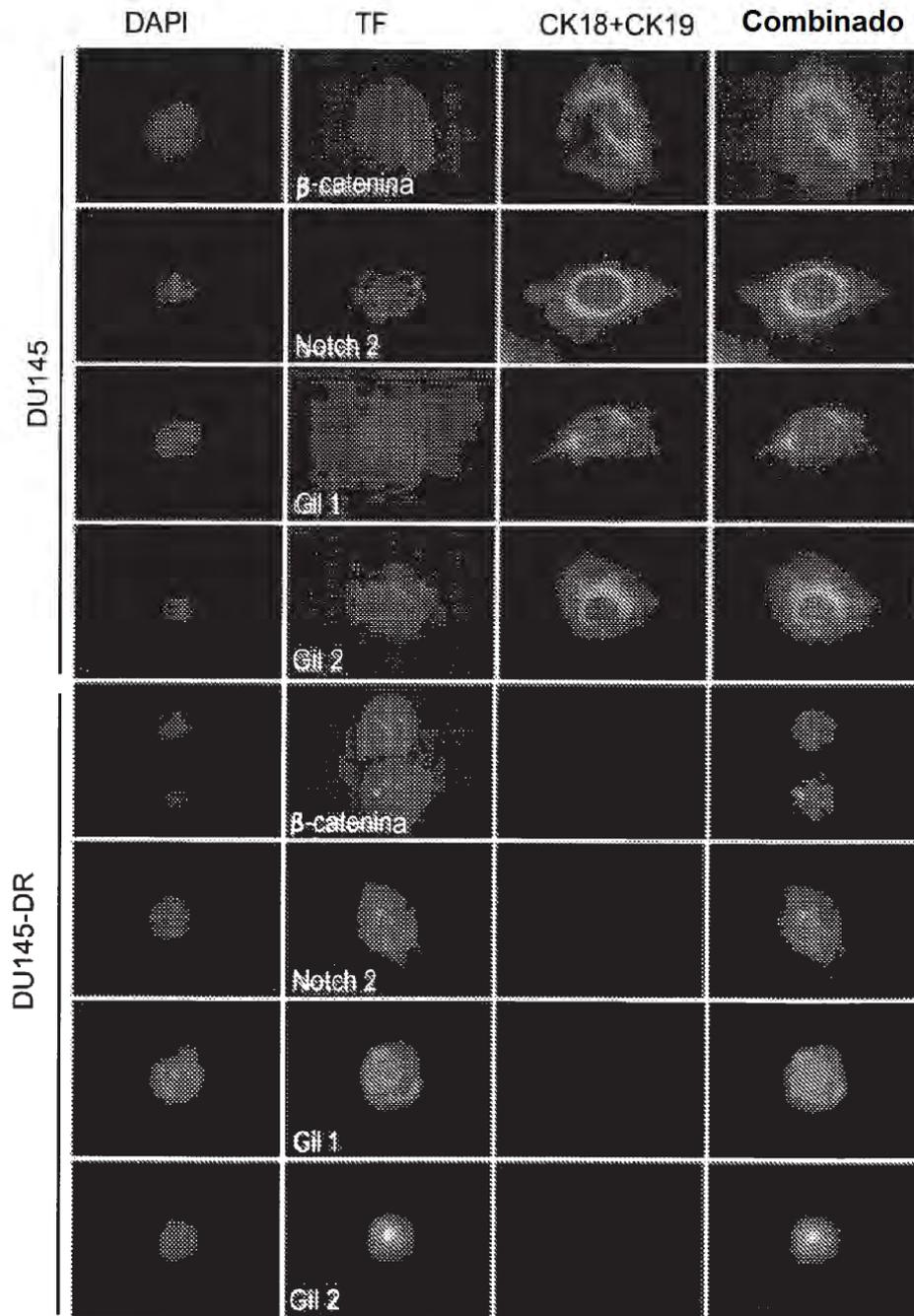


Figura 2d (continuación)

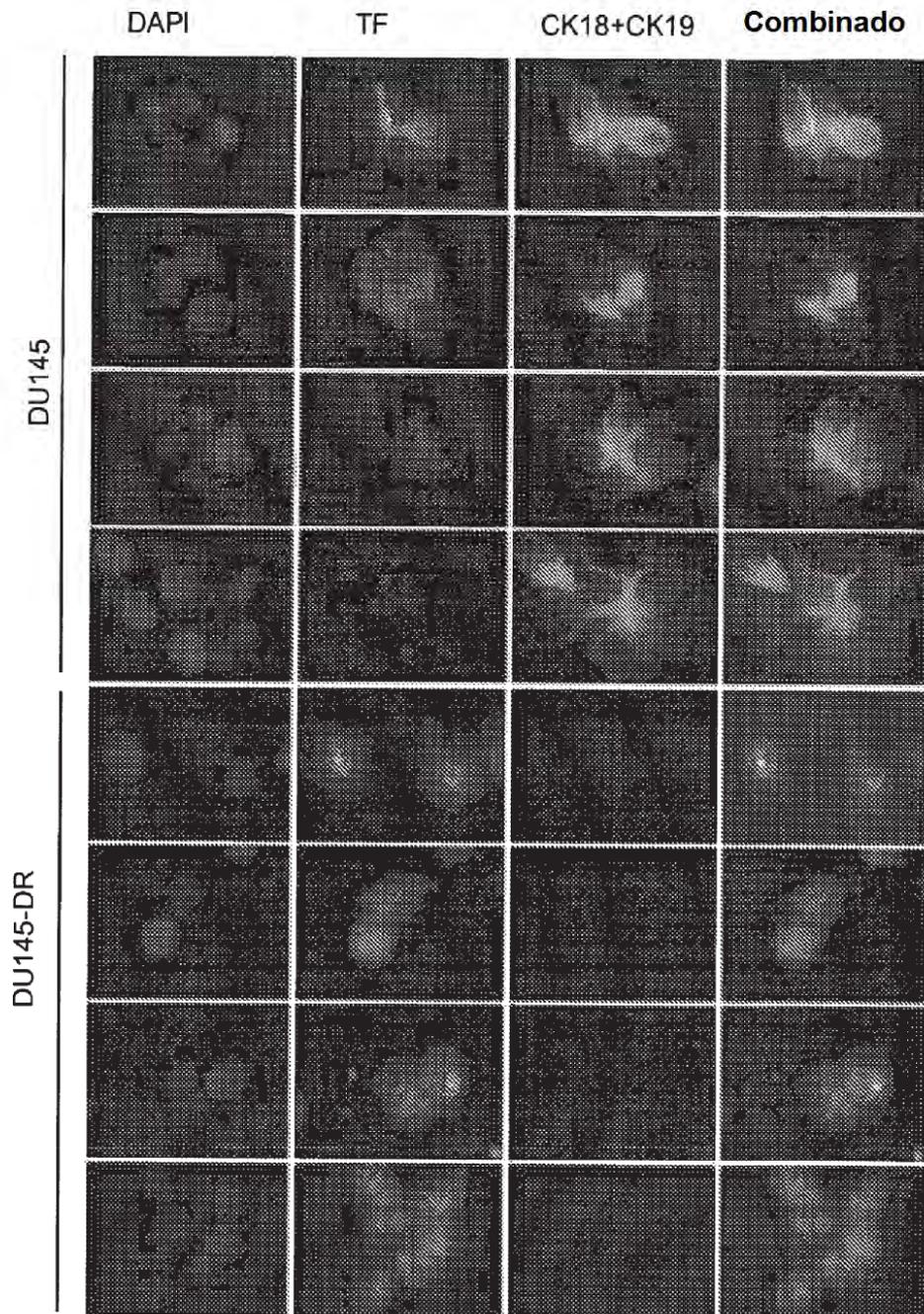
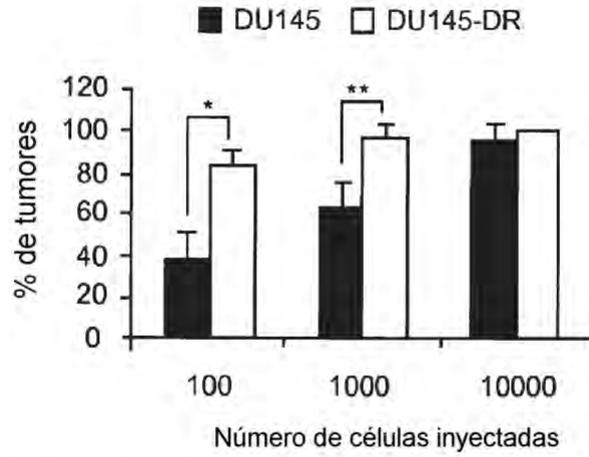
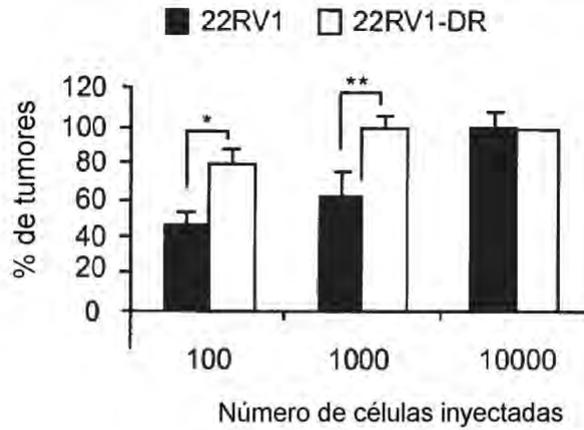


Figura 2e



Num. de células	100	1000	10000
DU145	112,1±10,5	91,7±12,8	54,9±4,9
DU145-DR	84,9±7,7*	60,0±8,5*	43,0±2,6*



Num. de células	100	1000	10000
22RV1	106,2±5,8	88,8±8,0	54,9±1,5
22RV1-DR	78,5±1,3*	49,3±1,3*	35,3±1,3*

Figura 2f

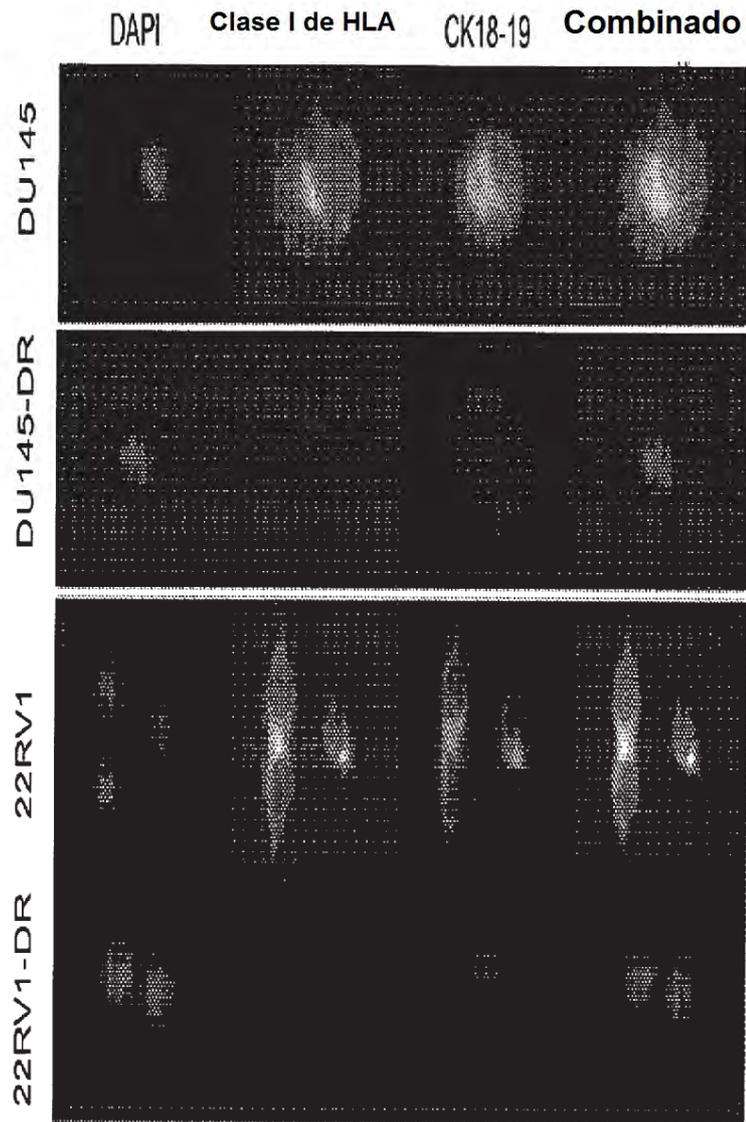


Figura 3a

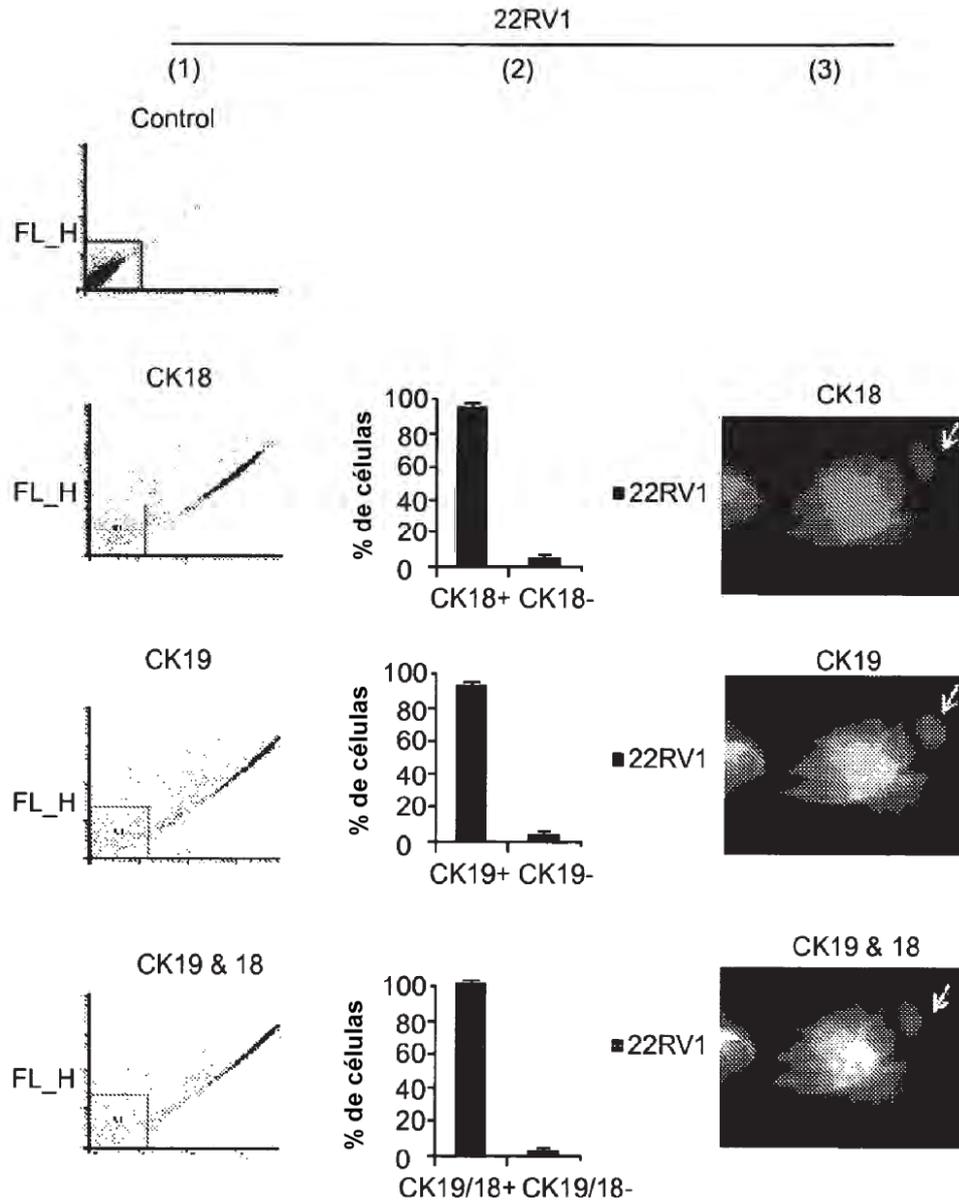


Figura 3b

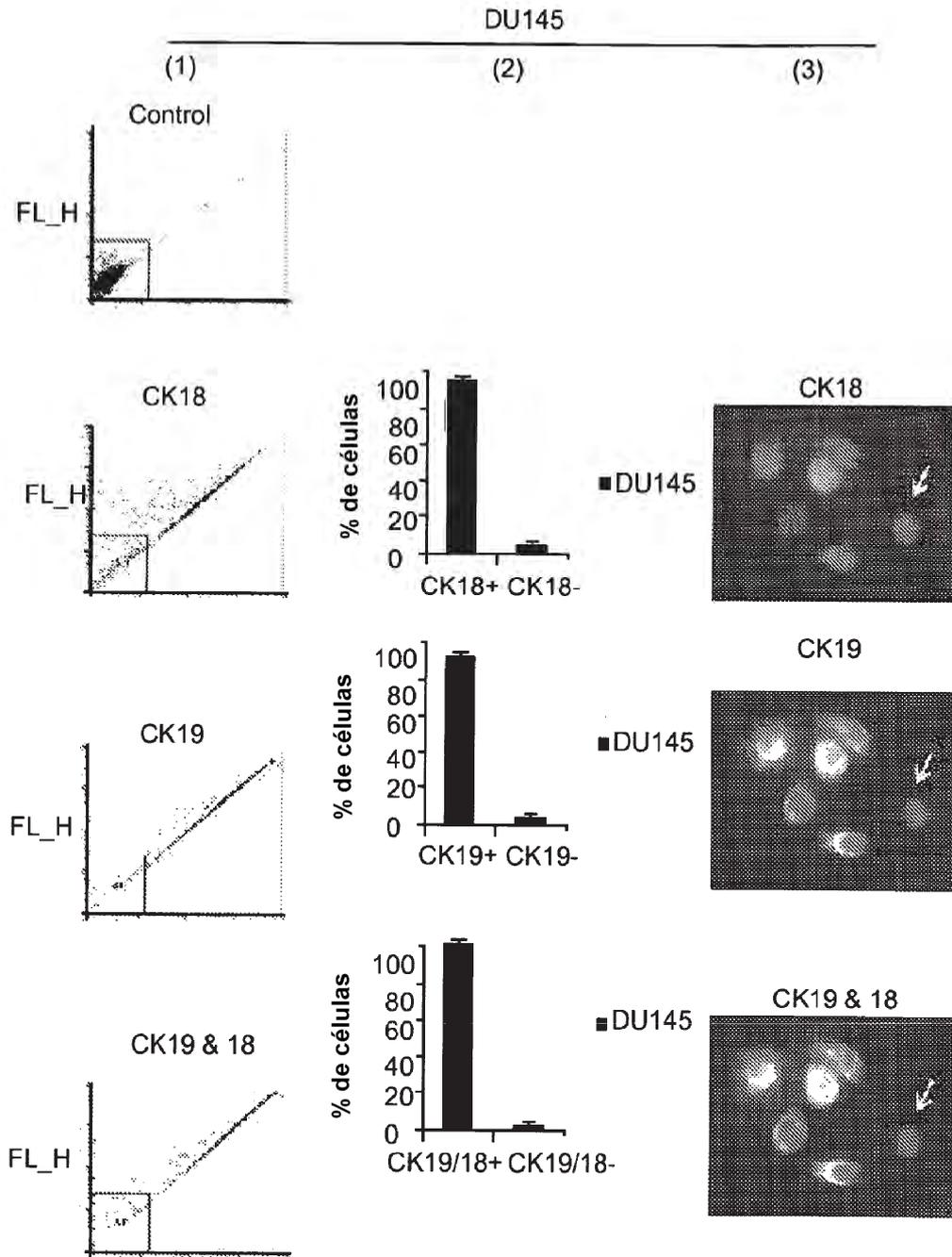


Figura 3c

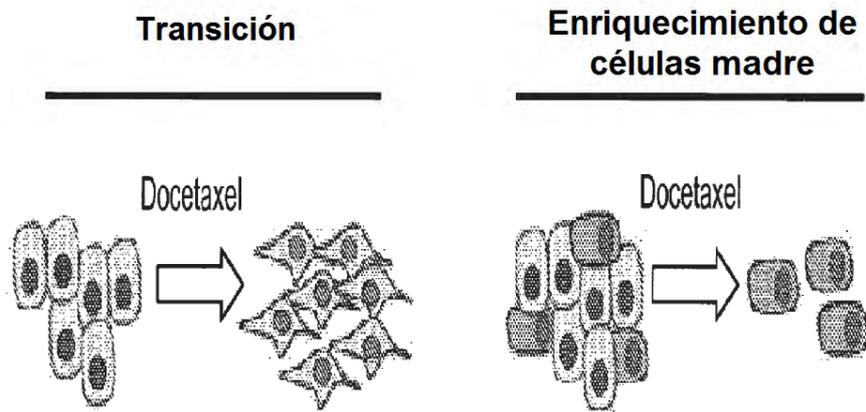
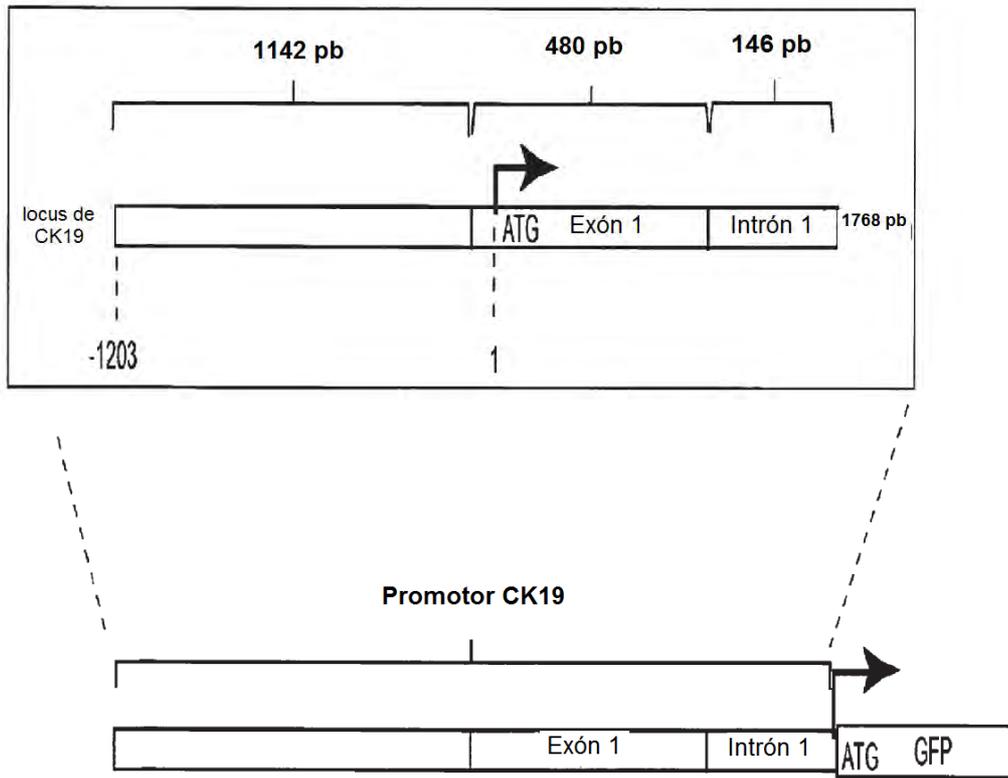


Figura 4a



Construcción pCK19-GFP

Figura 4b

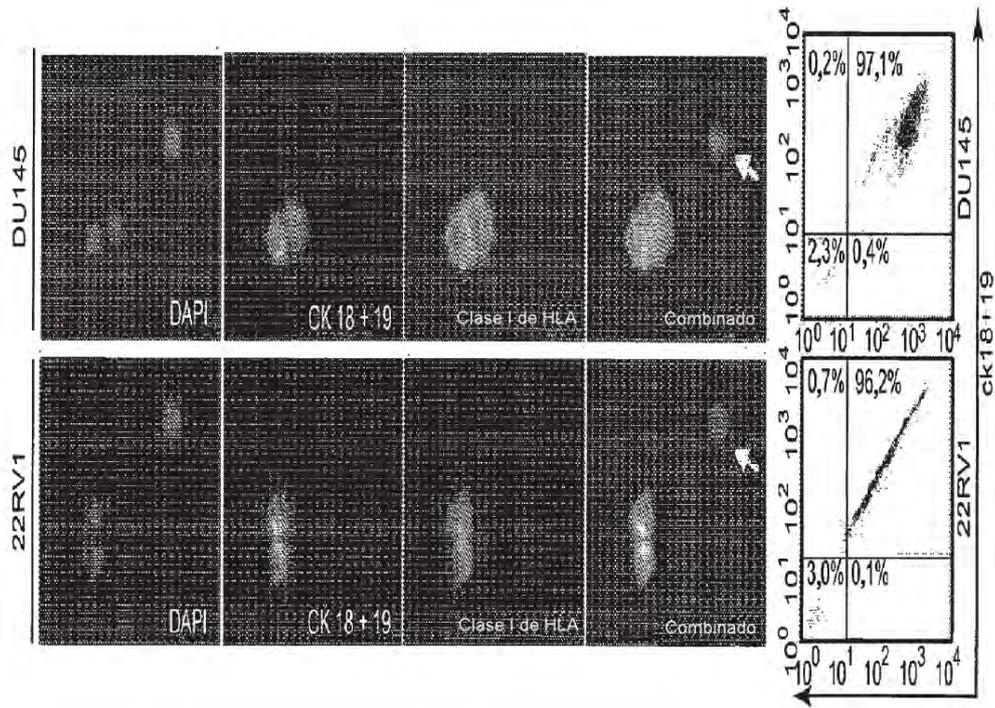


Figura 4c

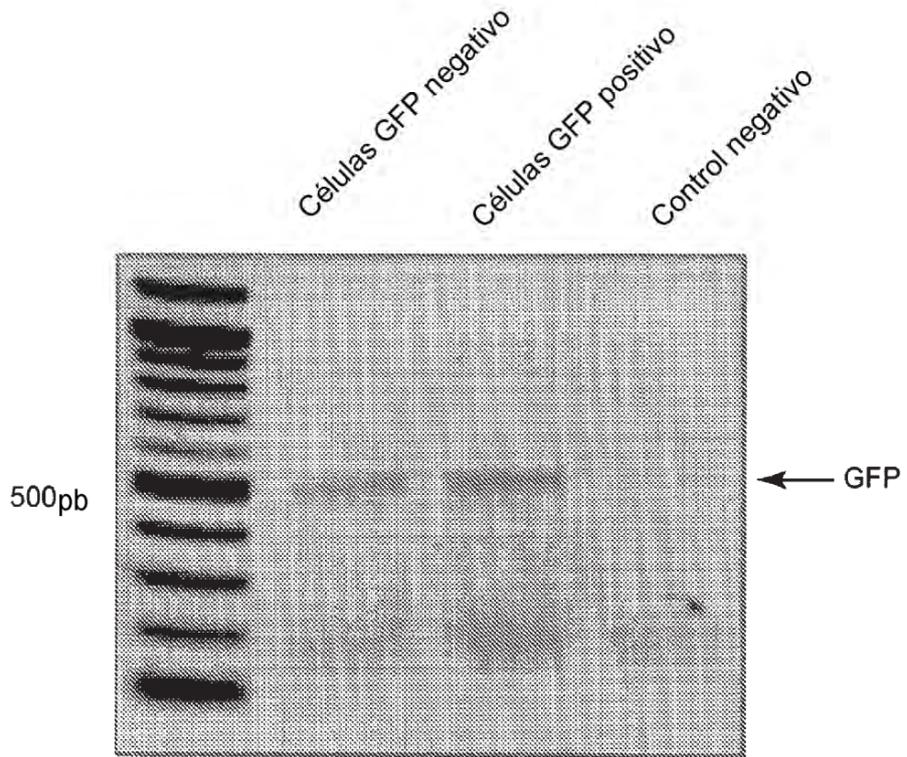


Figura 5a

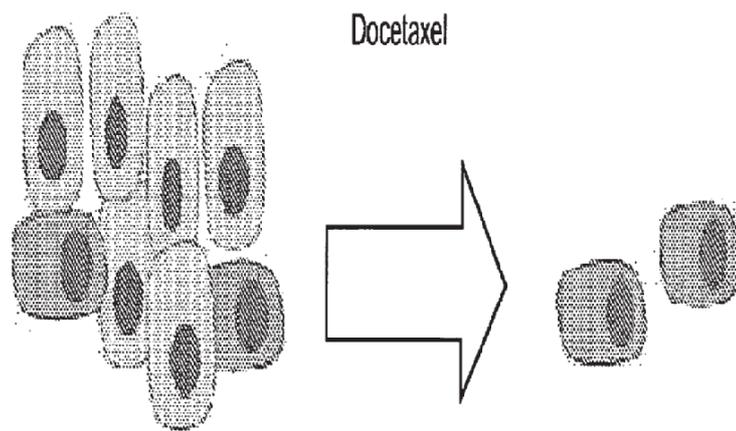


Figura 5b

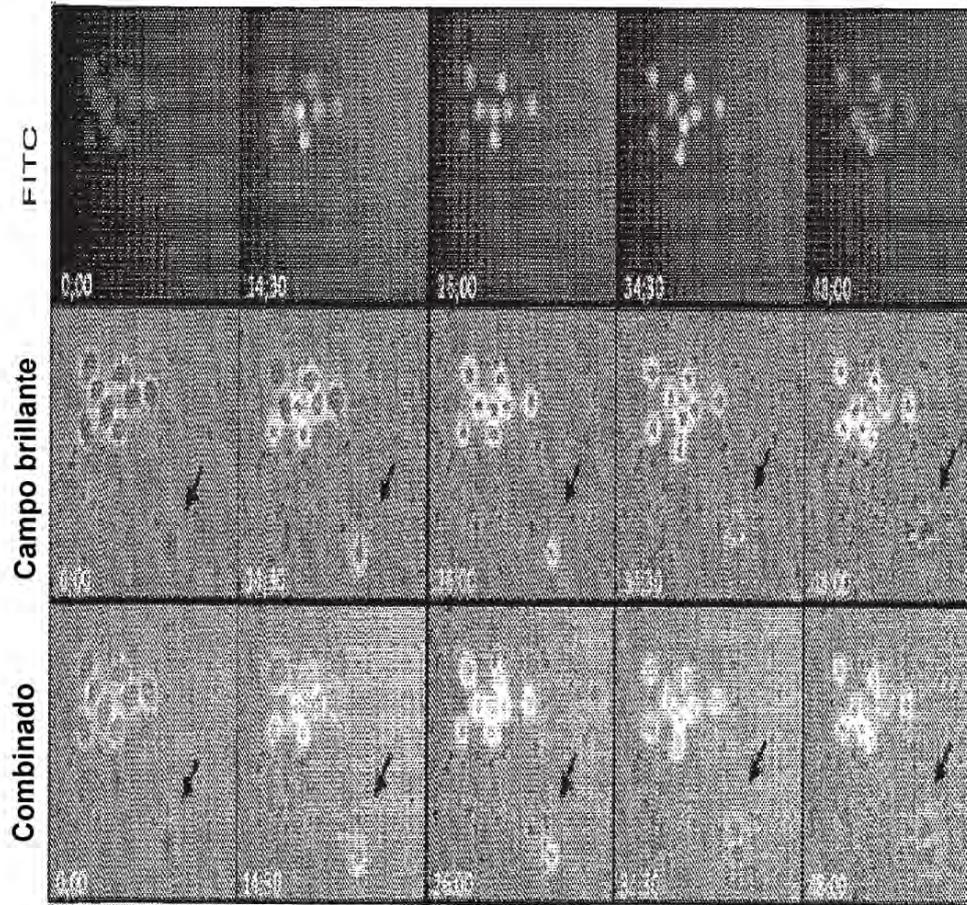


Figura 5b (continuación)

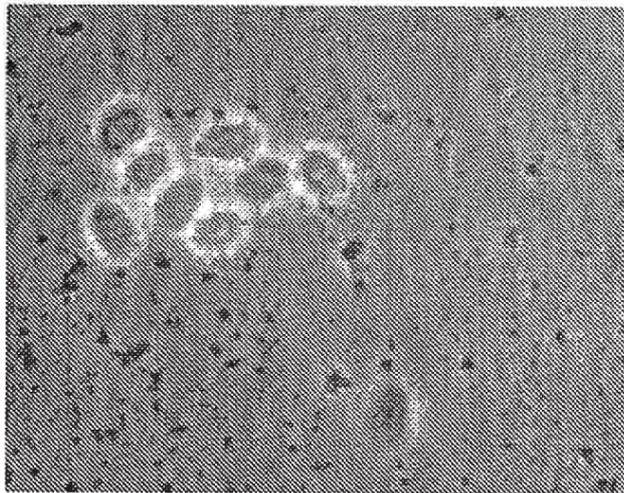


Figura 5c

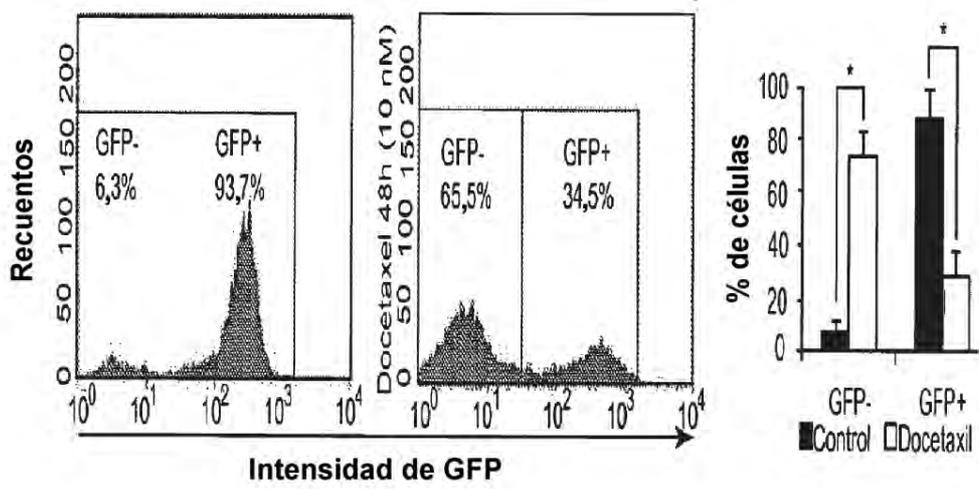


Figura 5d

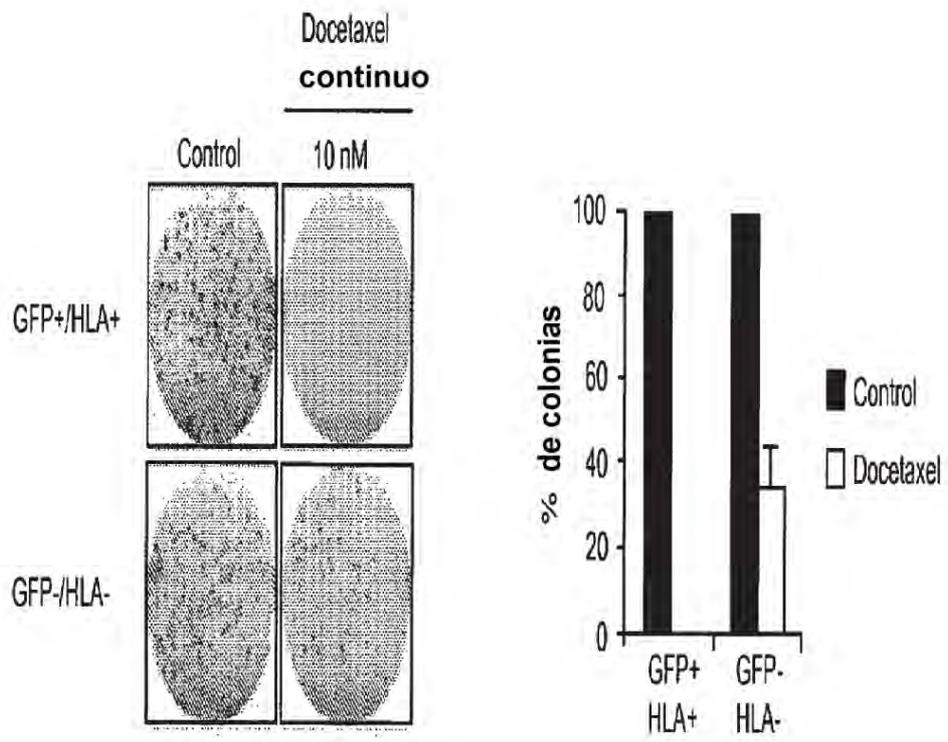


Figura 6a

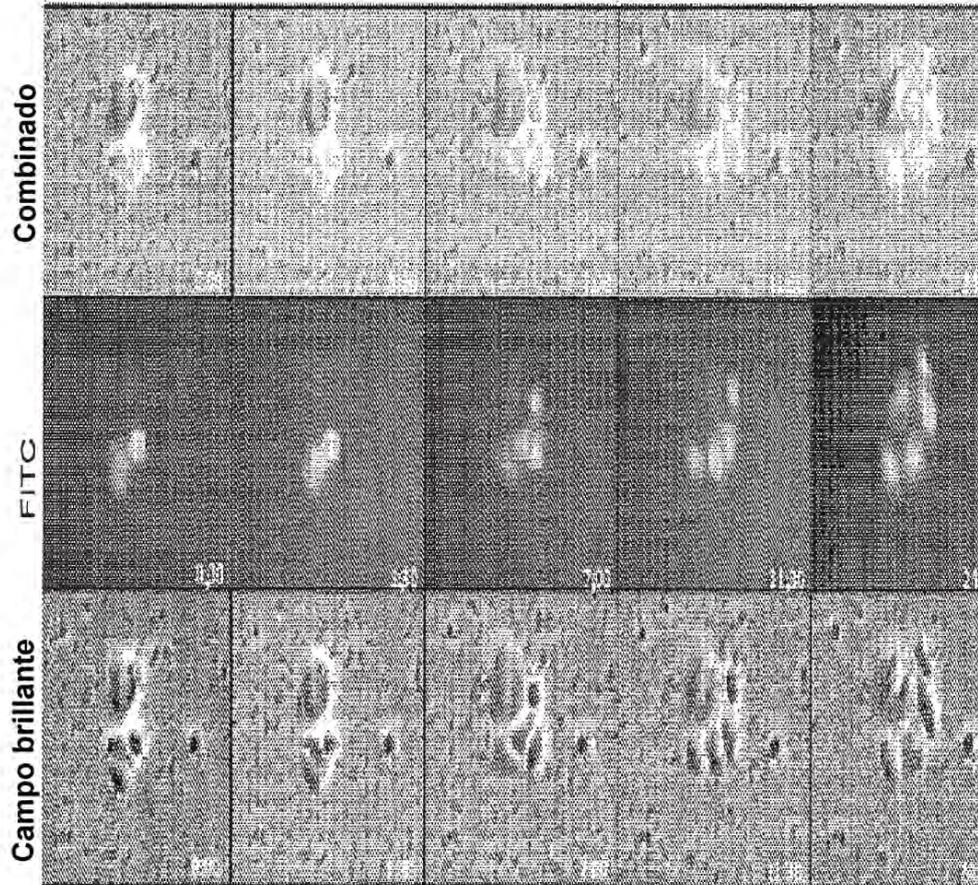


Figura 6b

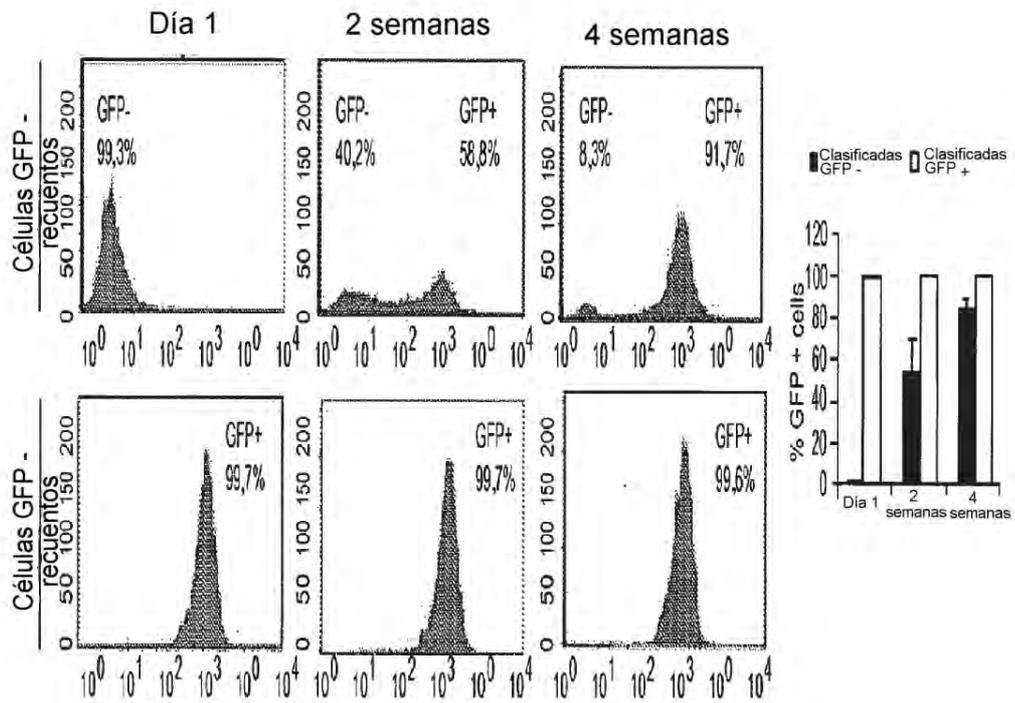


Figura 6c

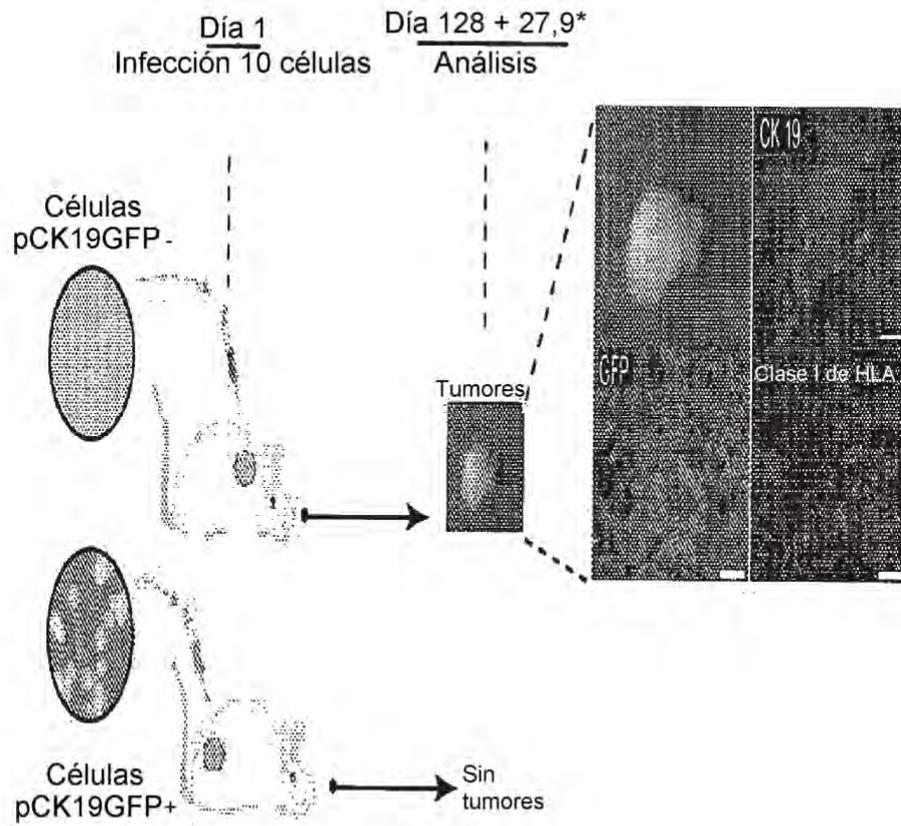


Figura 6d

Núm. de células	Latencia tumoral (días; media \pm DE)		
	10	100	1000
pCK19 GFP+/HLA+	-	167,5 \pm 30,4	135,1 \pm 10,4
pCK19 GFP-/HLA	128,0 \pm 27,9*	81,8 \pm 15,6*	59,1 \pm 13,4*

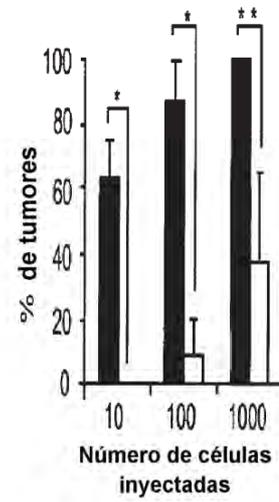


Figura 7a

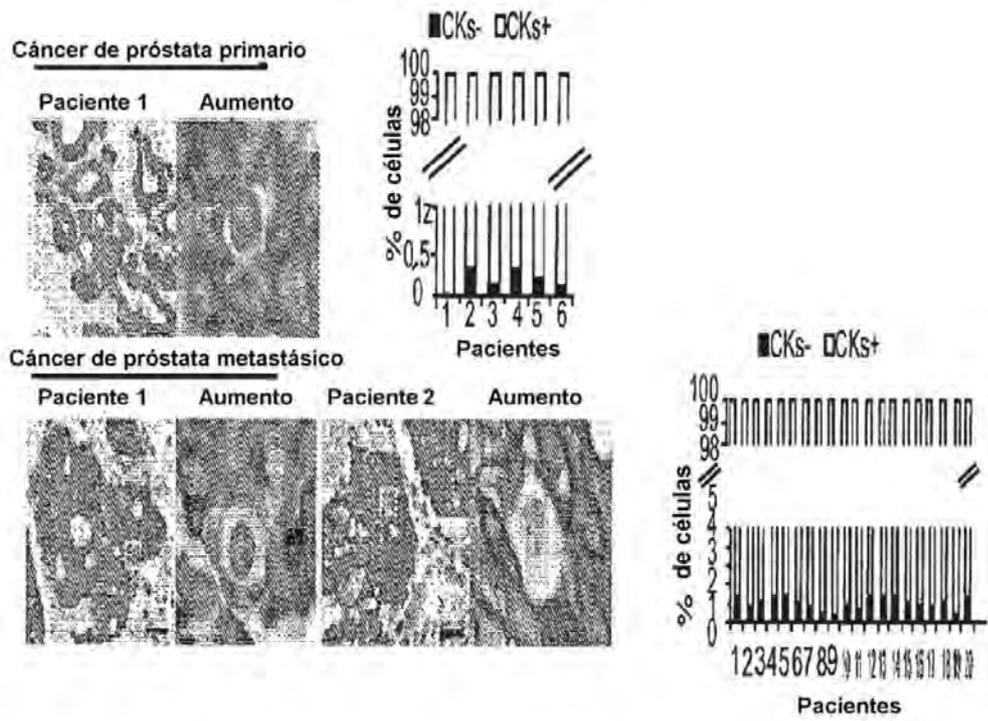


Figura 7b

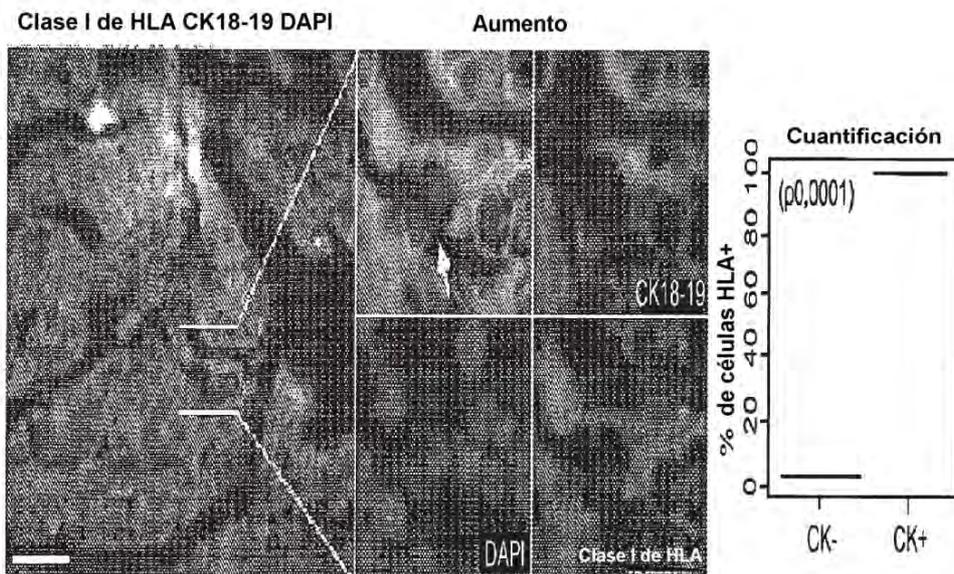


Figura 7c

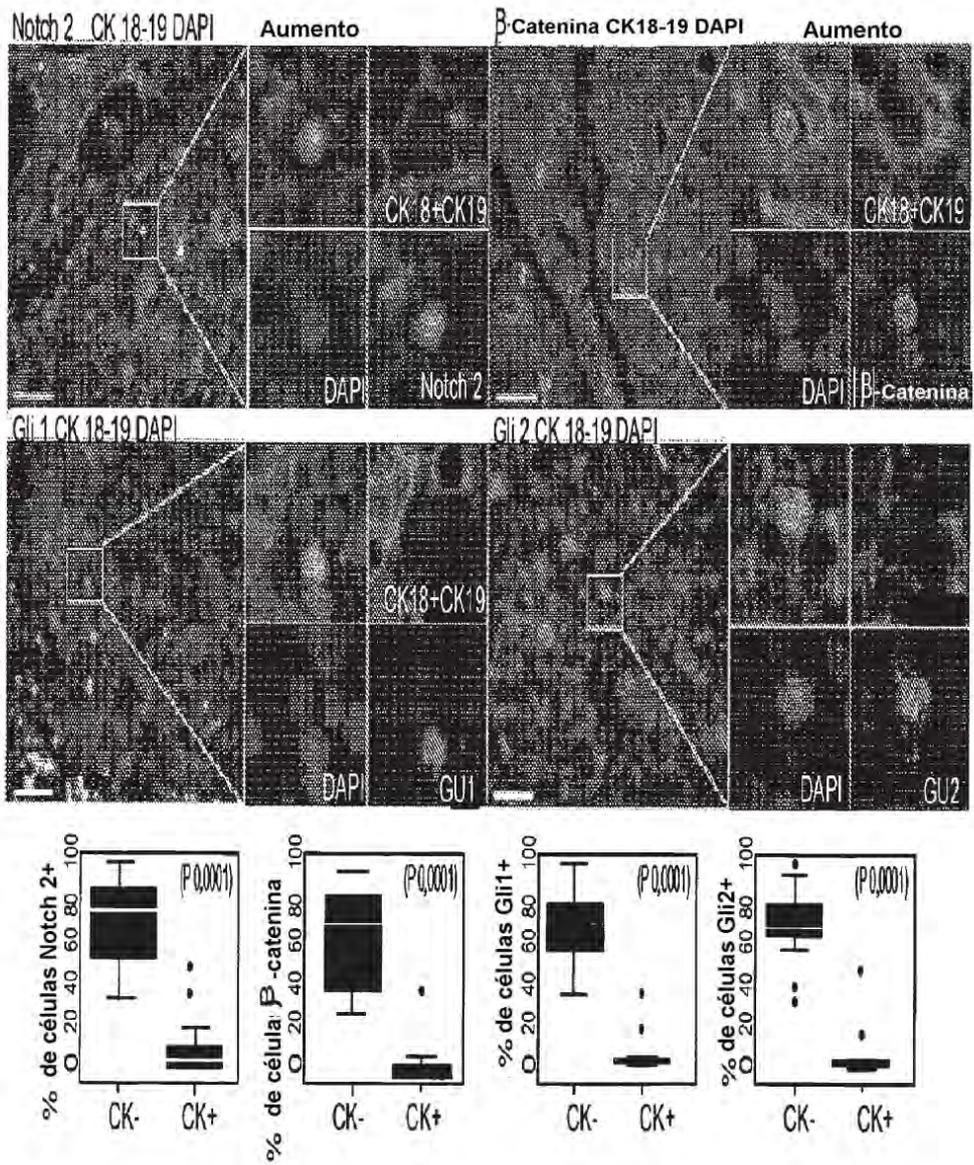


Figura 7d

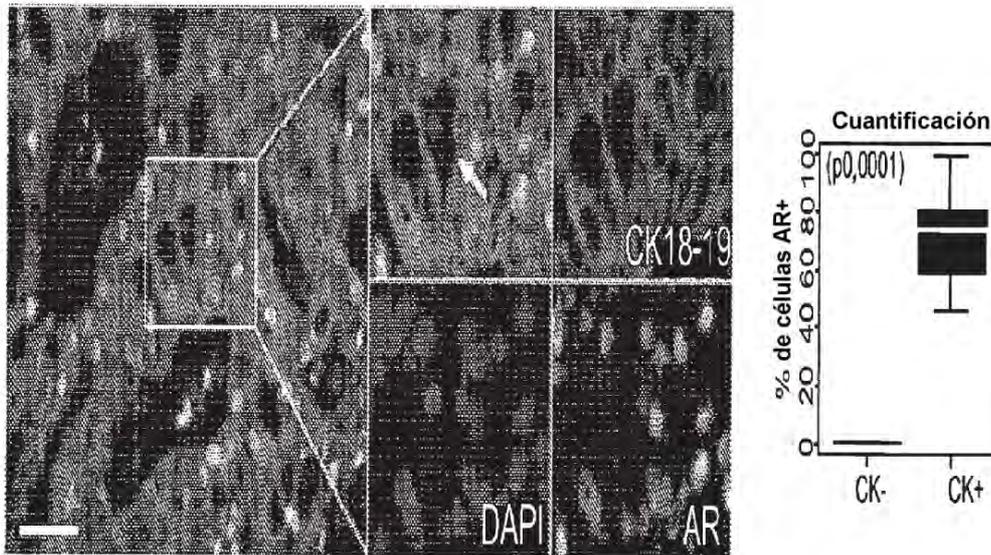


Figura 8

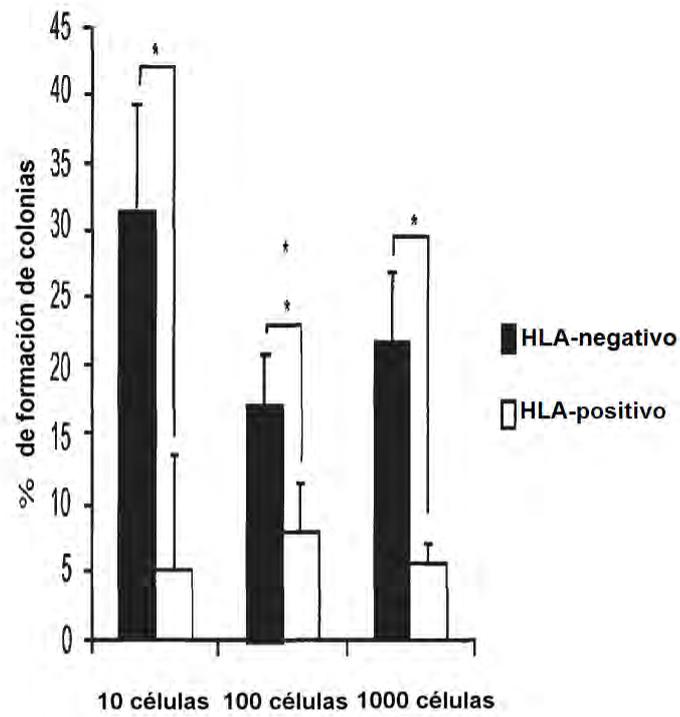
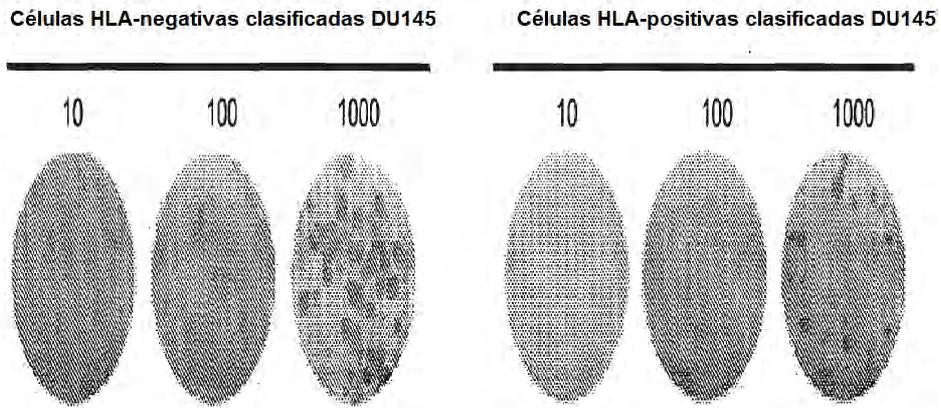


Figura 9a

Poblaciones clasificadas de tumores humanos primarios

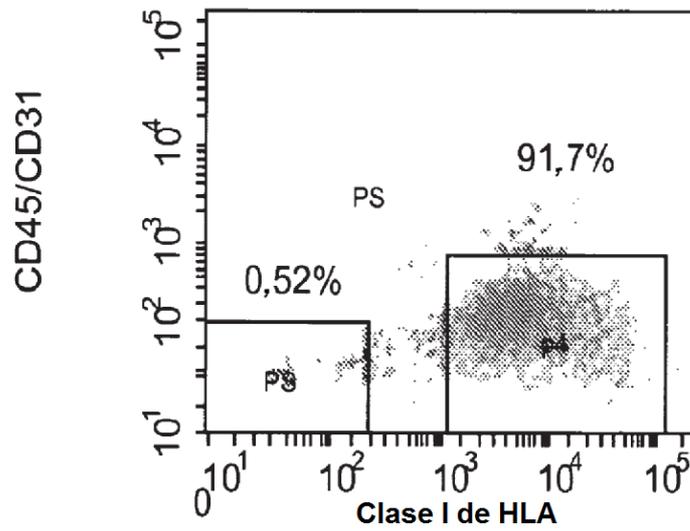
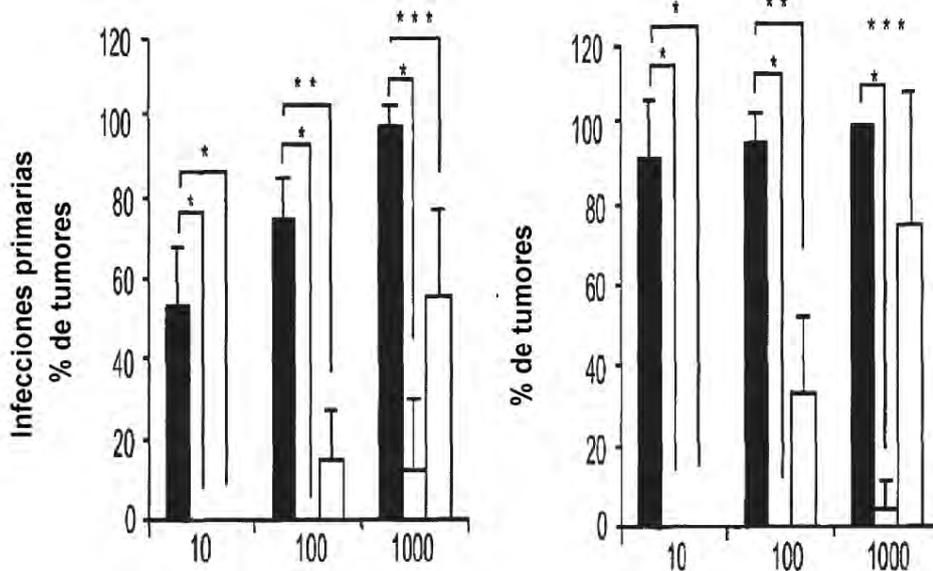


Figura 9b



N.º de células	Latencia tumoral (días; media ± DE)		
	HLA-	HLA+	No clasificadas
10	34,9±4,0	**	**
100	21,4±6,4	**	24,4±3,0**
1000	15,4±6,9	24,6±3,1*	21,2±4,6**

N.º de células	Latencia tumoral (días; media ± DE)		
	HLA-	HLA+	No clasificadas
10	25,8±0,3	**	**
100	18,1±3,4	*	23,4±0,1**
1000	16,5±6,3	23,8*	19,1±4,2**

Figura 9c

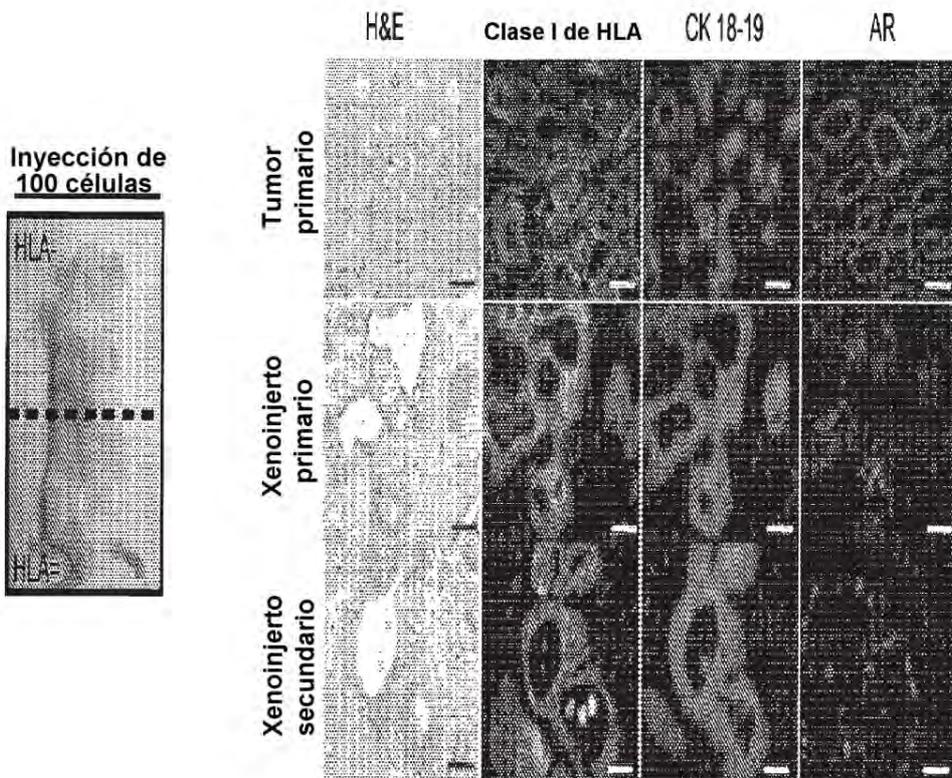


Figura 9d

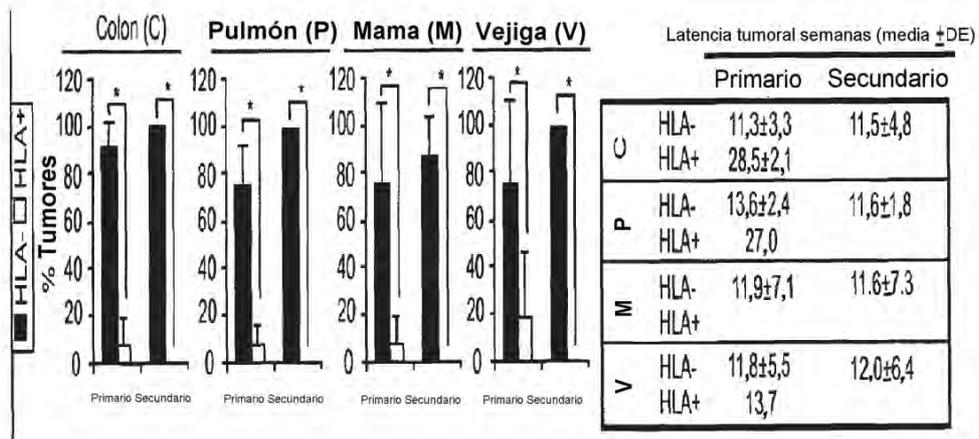


Figura 9e

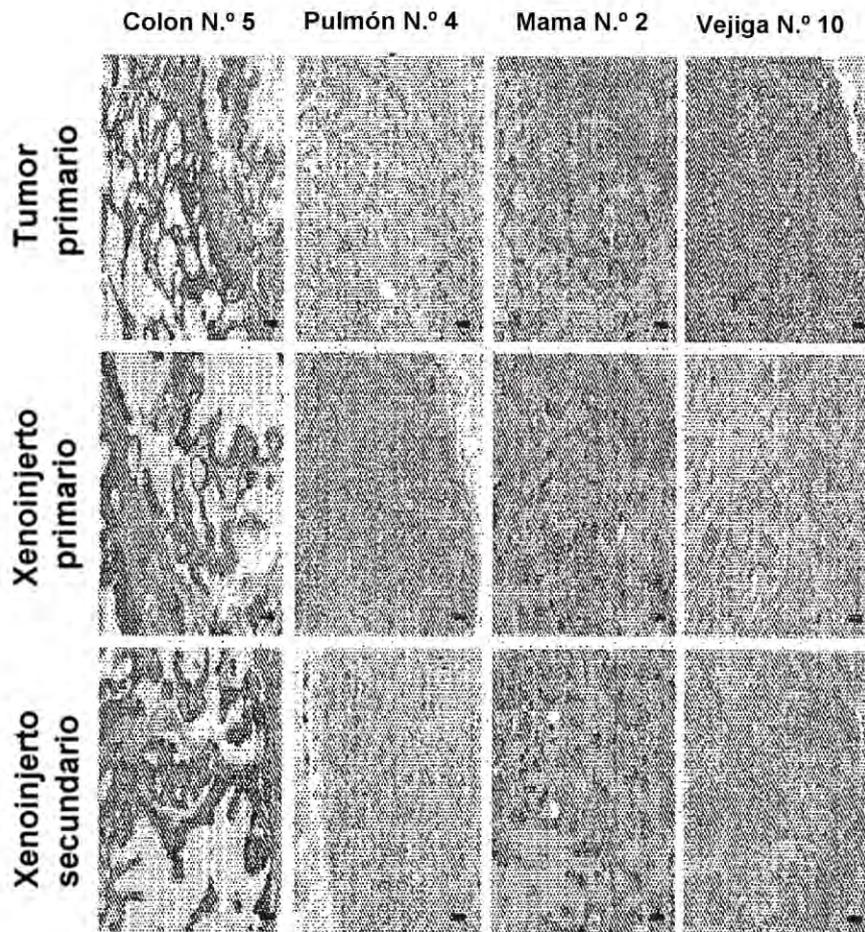


Figura 10a

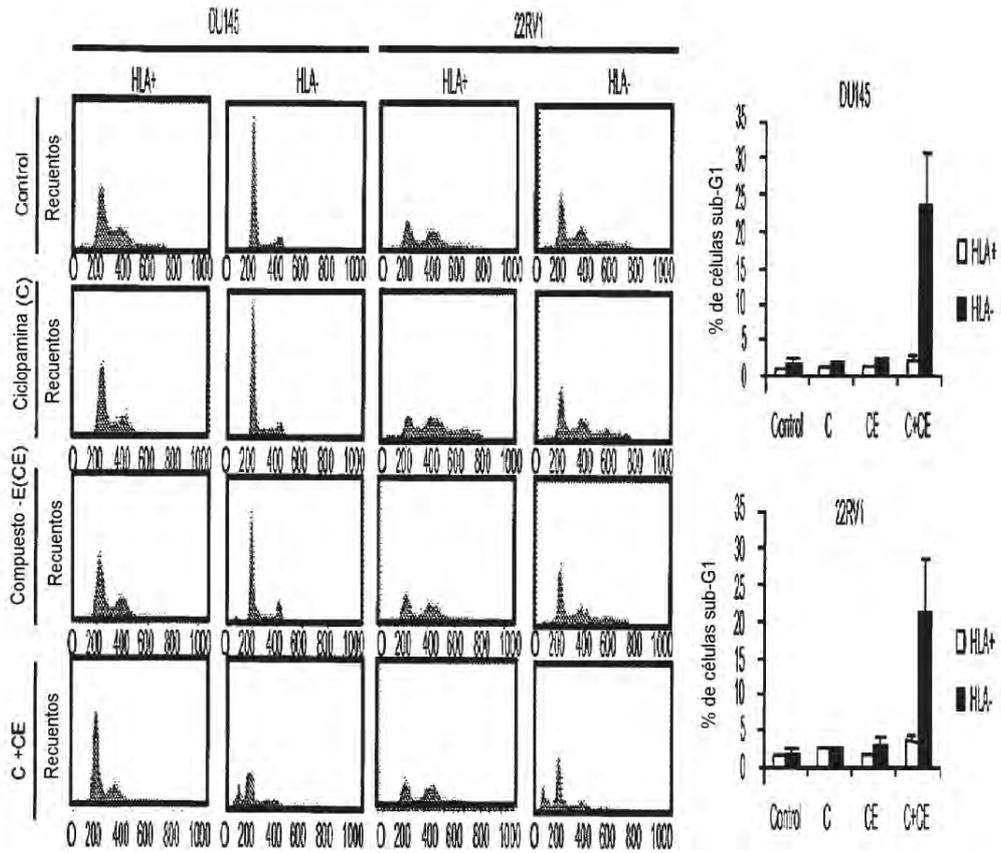


Figura 10b

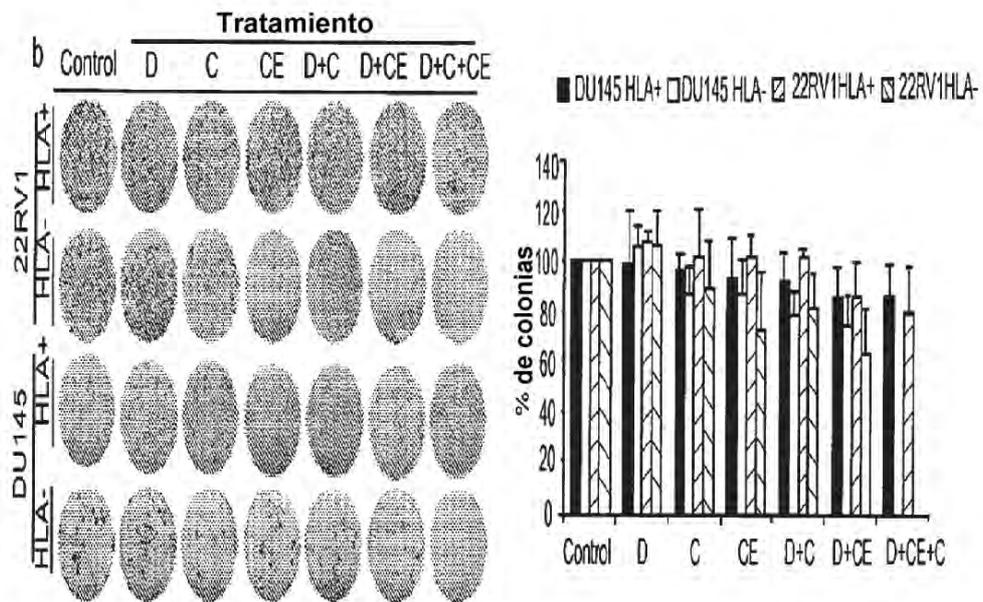


Figura 10c

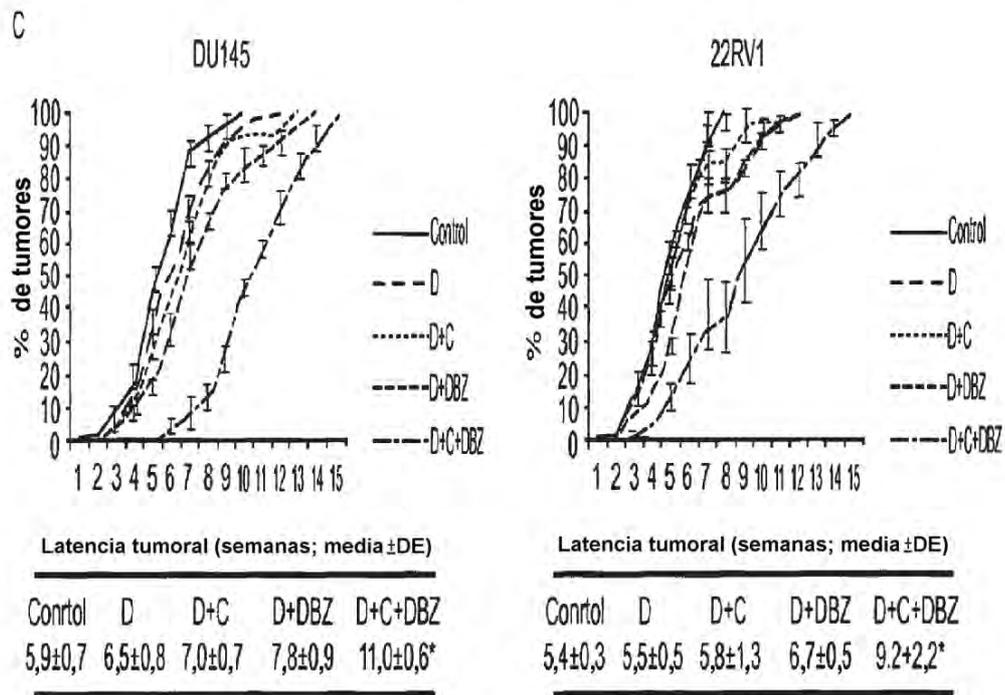


Figura 10d

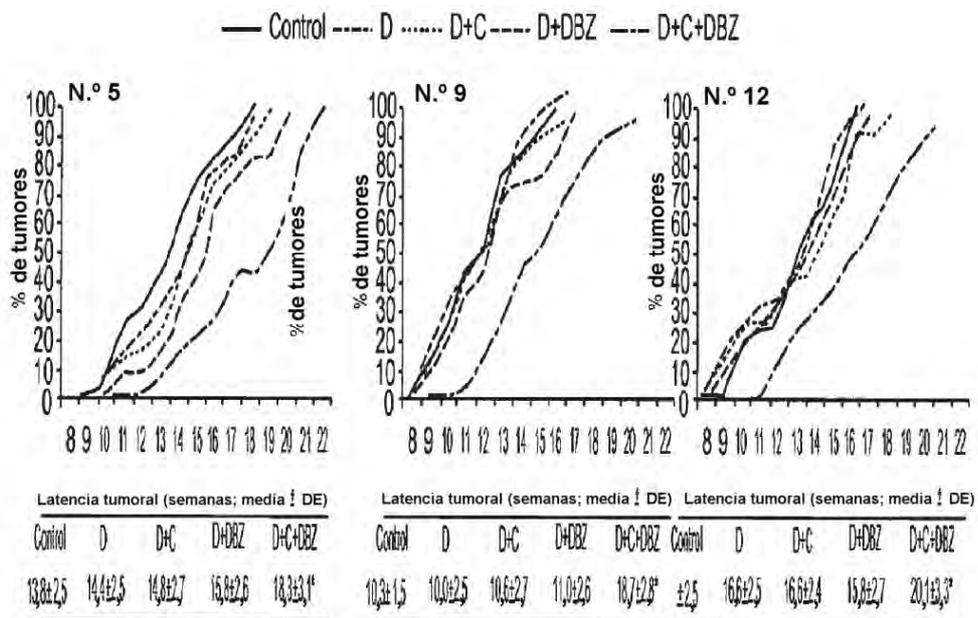


Figura 11

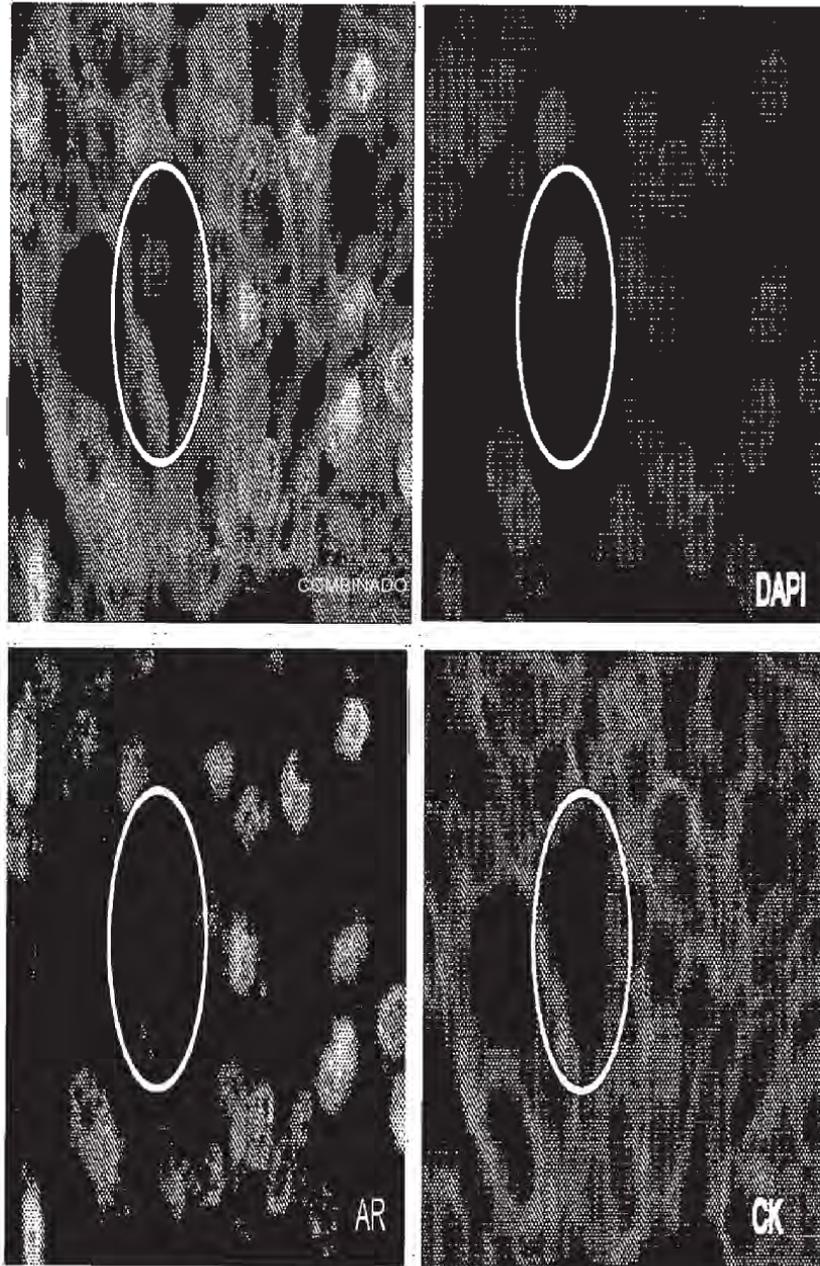


Figura 12

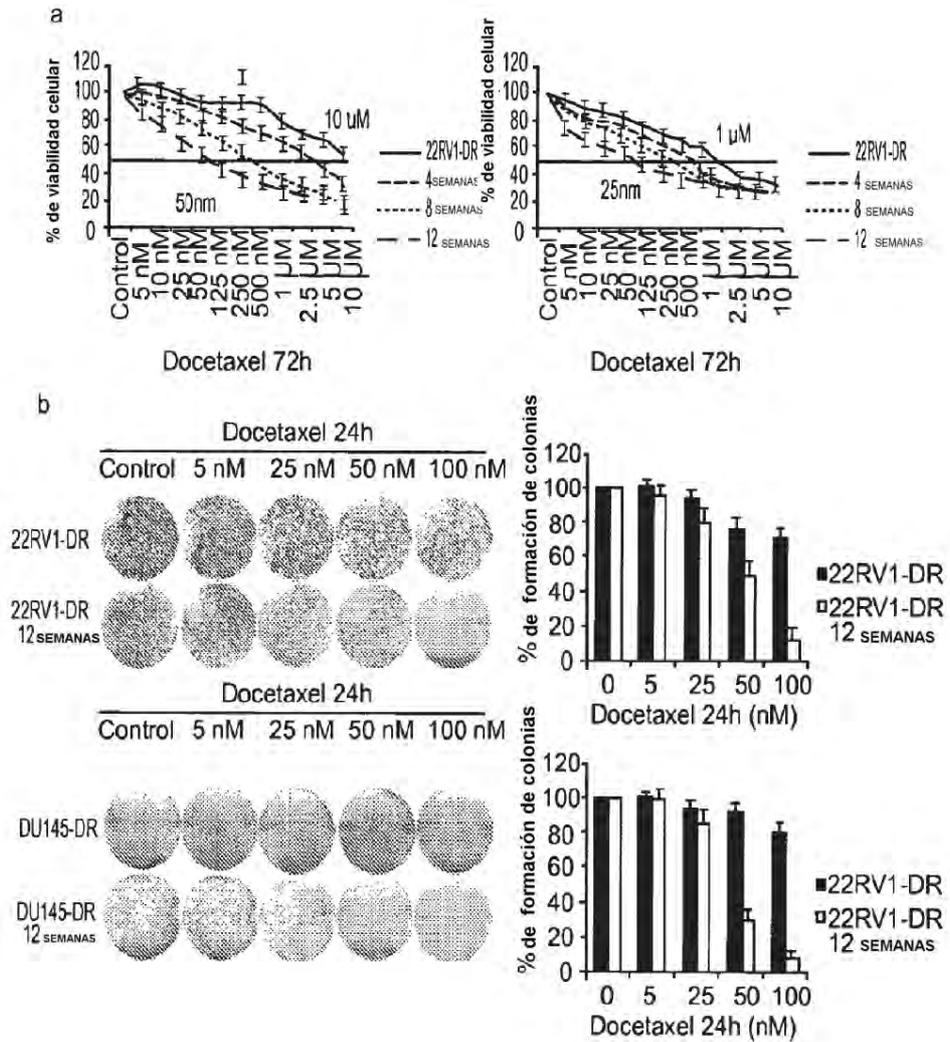


Figura 13

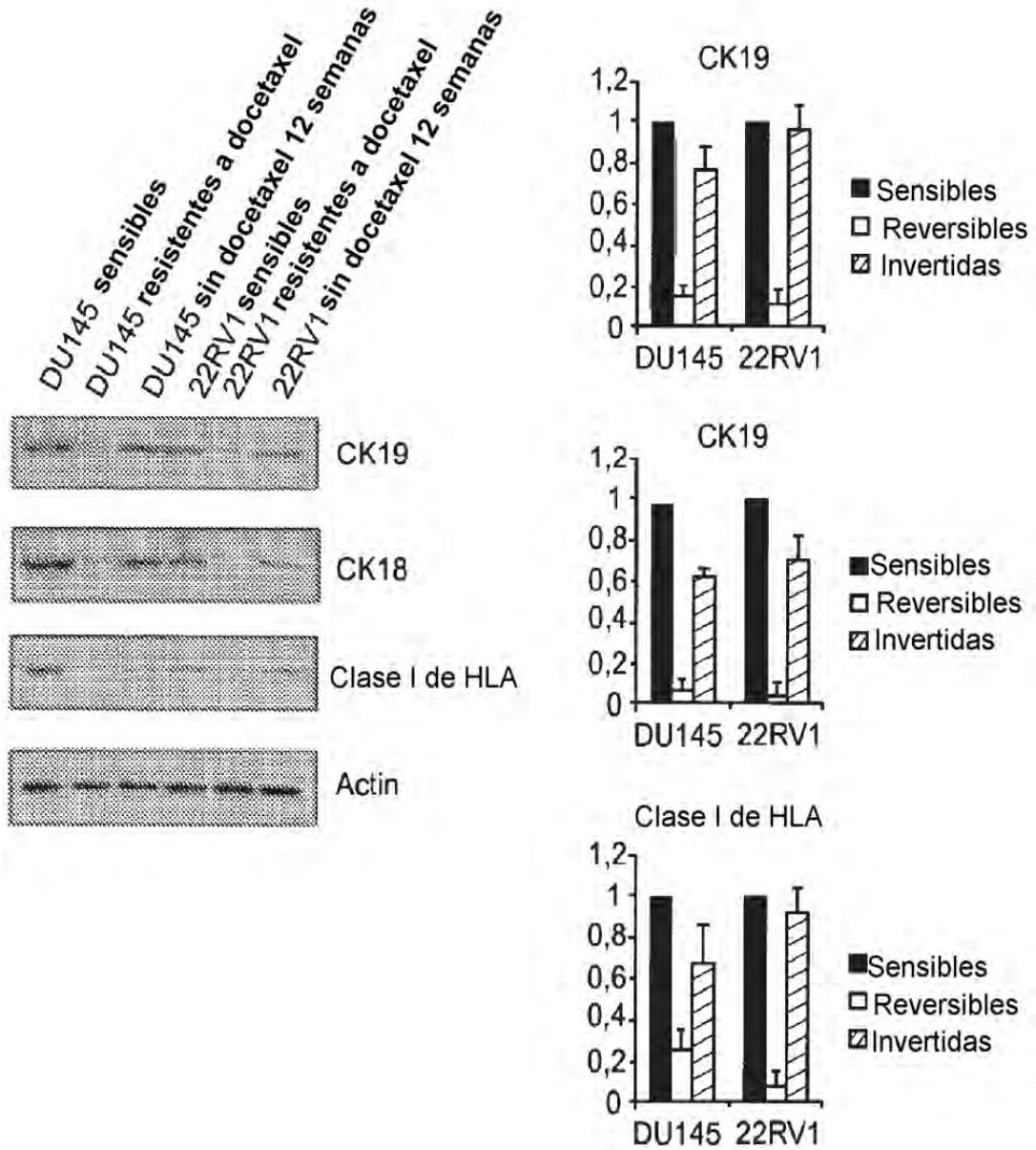


Figura 14

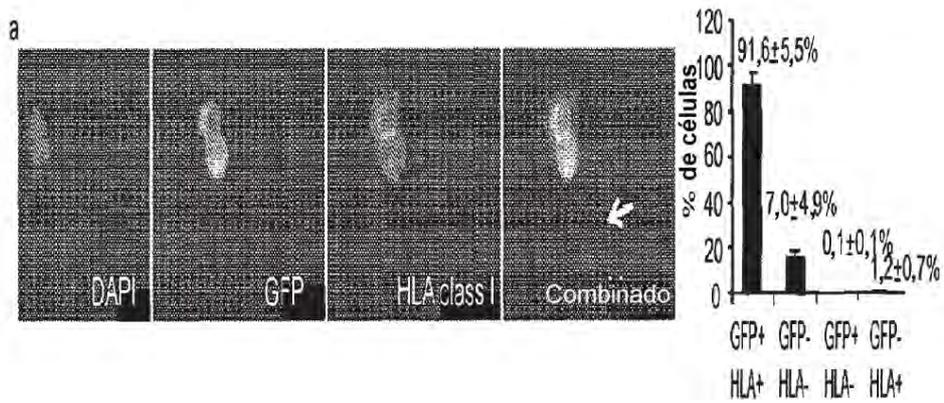
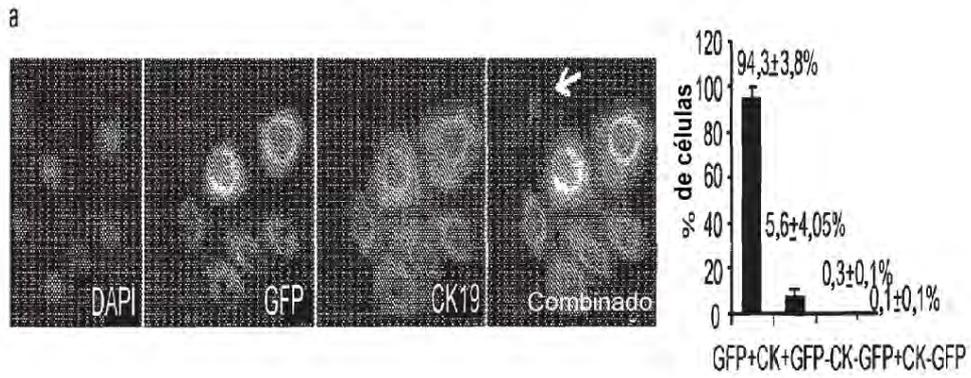
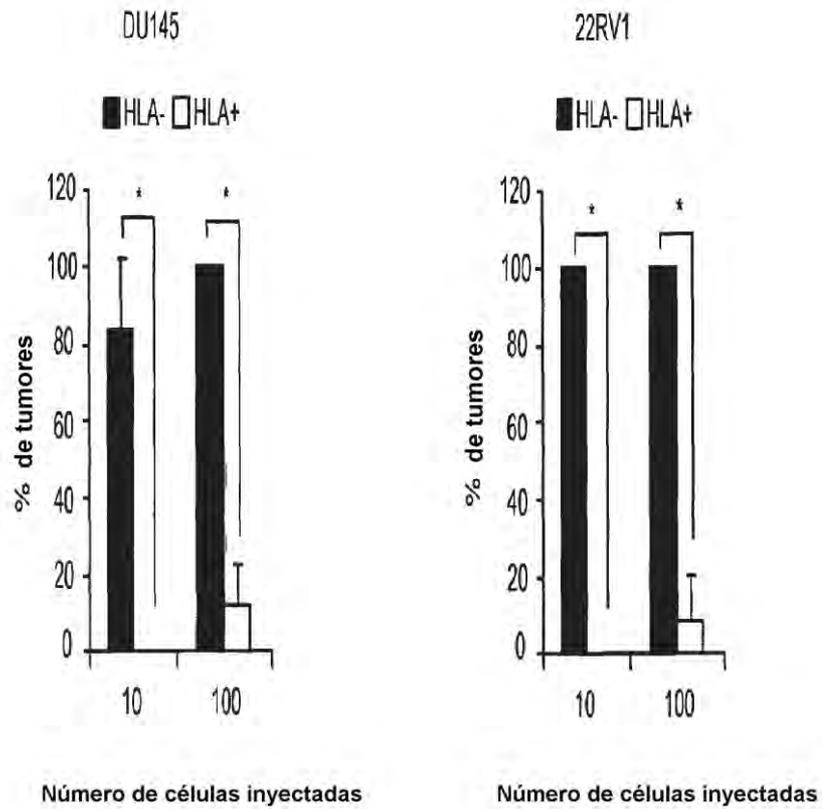


Figura 15



Número de células	Latencia tumoral (días; medias \pm DE)		Número de células	Latencia tumoral (días; medias \pm DE)	
	HLA-	HLA+		HLA-	HLA+
10	147,0 \pm 28,6	*	10	119,9 \pm 18,8	*
100	95,5 \pm 8,9	168,0 \pm 15,6*	100	85,0 \pm 1,6	139,0 \pm 21,2*

Figura 16

