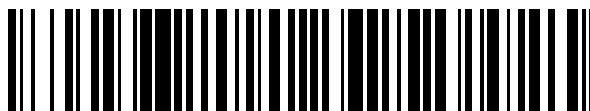


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 304**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C07K 14/72 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2008 PCT/NL2008/050543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2009 WO09022907**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08793835 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2190978**

54 Título: **Método para identificar, ampliar y retirar células madre adultas y células madre cancerosas**

30 Prioridad:

10.08.2007 EP 07114192

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2017

73 Titular/es:

**KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN
WETENSCHAPPEN (100.0%)**

**Uppsalalaan 8
3584 CT Utrecht , NL**

72 Inventor/es:

**CLEVERS, JOHANNES CAROLUS;
BARKER, NICHOLAS;
HAEGEBARTH, ANDREA y
VAN DE WETERING, MARCUS LAMBERTUS**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 617 304 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).

Método para identificar, ampliar y retirar células madre adultas y células madre cancerosas.**Descripción**

[0001] La invención se refiere a los campos de la bioquímica, farmacia y oncología. La invención se refiere particularmente al uso de nuevos marcadores de células madre para el aislamiento de células madre. La invención se refiere además a las células madre obtenidas y su uso en, por ejemplo, investigación o tratamiento, por ejemplo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tejido dañado o enfermo. La invención se refiere además a medios adecuados para el tratamiento de cáncer y aún más específicos para el tratamiento de células madre cancerosas.

Células madre adultas (revisado en 1)

[0002] Las células madre adultas se encuentran en muchos, si no todos, los órganos de seres humanos y ratones adultos. Aunque pueda haber gran variación en las características exactas de las células madre adultas en tejidos individuales, las células madre adultas comparten las siguientes características: Retienen un fenotipo indiferenciado; su descendencia puede diferenciarse hacia todos los linajes presentes en el tejido pertinente; conservan las capacidades de auto-mantenimiento a lo largo de la vida; y son capaces de regenerar el tejido pertinente después de la lesión. Las células madre residen en un lugar especializado, el nicho de células madre. El nicho suministra típicamente los contactos y las señales apropiados célula a célula para mantener el carácter "de célula madre".

[0003] Algunos tejidos muestran un alto nivel de facturación de estado estacionario. Buenos ejemplos son el sistema hematopoyético, la piel y el epitelio intestinal. Se supone que las células madre en dichos tejidos contribuyen continuamente al proceso de auto-renovación. Otros tejidos, como el cerebro, el miocardio o el músculo esquelético, muestran muy poca o ninguna actividad proliferativa en situaciones de estado estacionario. Las células madre de tales tejidos son más probablemente inactivas y sólo se vuelven activas cuando se pierdan células diferenciadas, por ejemplo, tras una lesión.

[0004] Células madre de la médula ósea han sido objeto de una intensa investigación durante los últimos 30 años. El trabajo con otras células madre adultas se ha iniciado más recientemente. Se ha logrado un buen avance con un número limitado de éstas, es decir, la célula madre epidérmica, la célula madre del folículo piloso, las células madre neuronales y la célula madre de las glándulas mamarias. En una demostración dramática, se demostró que una única célula madre de glándula mamaria regeneraba todo el epitelio mamario tras la introducción en la almohadilla de grasa mamaria (2).

[0005] El estudio de las células madre tiene dos requisitos previos:

- 1) Debe ser posible reconocer y aislar células madre primarias vivas. La disponibilidad de marcadores específicos (combinaciones de) es esencial. Como ejemplifican los estudios seminales en médula ósea humana y de ratón, las combinaciones de marcadores de superficie celular permiten la clasificación de poblaciones de células fuertemente enriquecidas.
- 2) *vitro* de cultivos celulares *in o en* ensayos de trasplante *in vivo* posteriormente permiten la demostración de generación a largo plazo de todos los tipos de células diferenciadas. Típicamente, a partir de estos sistemas de ensayo, las células madre se re-aislan y se ensayan en serie para demostrar el tallo a largo plazo y la auto-renovación.

[0006] Como un ejemplo no limitante de células madre adultas, las células madre intestinales se discuten en más detalle.

Células madre intestinales

[0007] El epitelio intestinal es el tejido más rápido de auto-renovación en el adulto. Se cree que un puñado de células madre se encuentra en la base de cada cripta intestinal para garantizar la renovación continua e ilimitada. En comparación con otros tejidos rápidamente auto-renovables, las células madre intestinales han permanecido bastante evasivas. No existen ensayos *ex vivo* o de trasplante para estas células, y todo el conocimiento de las células madre intestinales se deriva de un análisis histológico de las criptas *in situ*. Las células madre intestinales se dividen más lentamente que sus proliferantes descendientes que llenan las posiciones ascendentes de la cripta. Si bien el consenso es que las células madre del colon se colocan en el fondo de las criptas, la localización de las células madre en el intestino delgado sigue siendo un tema polémico. Potten y otros han proporcionado evidencia que apoya una localización inmediatamente por encima del compartimiento de células de Paneth en la posición +4, usando el ensayo de Retención de ADN de Largo Plazo (revisado en 3.4). Los estudios de seguimiento de linaje han instigado a Bjerknes y Cheng a proponer que un tipo diferente de célula, la llamada célula de columna de base de cripta, puede representar la célula madre genuina. Estas células columnares de base de cripta se entremezclan con células Paneth en las posiciones más bajas de las criptas (5).

[0008] Recientemente se han propuesto algunos marcadores de genes candidatos para las células madre

intestinales: es decir, Musashi (6,7) y fosfo-PTEN (8). Nosotros y otros encontramos que el dominio de expresión Musashi contiene 30-50 células por cripta, muchas más que células madre (véase más abajo), mientras que el marcador fosfo-PTEN puede representar un artefacto (9).

[0009] El número de células madre adultas en las criptas se ha estimado entre 1 y 6, según el enfoque experimental utilizado (10). Sigue siendo un asunto de debate si el carácter de célula madre es un conjunto de propiedades que se autoperpetúan por división asimétrica a lo largo de los años o si el fondo de la cripta actúa como un nicho que confiere estas propiedades a los progenitores que residen en su interior. El estudio de pedigríes celulares en criptas individuales mediante el análisis de las etiquetas de metilación (11) indica que las células madre se dividen estocásticamente de una manera asimétrica (es decir, una célula madre hija más un progenitor diferenciador) o simétrica (es decir, dos células madre hijas o dos progenitores diferenciadores). Cabe señalar que, aunque la existencia de divisiones celulares asimétricas y simétricas se infiere de los estudios anteriores, no se ha observado hasta el momento ninguna prueba formal de distribución asimétrica de determinantes durante la mitosis en el epitelio intestinal.

[0010] Cuando llegan a la tercera parte superior de las criptas colorrectales (o las vellosidades en el intestino delgado), progenitores comprometidos se diferencian en células absorbentes (colonocitos/enterocitos) o células de linaje de secreción (células caliciformes, células enteroendocrinas, células de Paneth). A partir de este momento, las células diferenciadas continúan su migración hacia las vellosidades en bandas coherentes que se extienden a lo largo del eje de cripta-vellosidad o se organizan en el epitelio superficial del colon en grupos de aspecto hexagonal. Como excepción a esta regla, las células de Paneth migran hacia el fondo de la cripta en el intestino delgado (revisado en 12).

Células madre cancerosas (revisadas en 13, 14)

[0011] La hipótesis de las células madre cancerosas postula que una pequeña reserva de células autosostenibles es exclusivamente capaz de auto-renovarse y mantener el tumor. Estas células madre cancerosas pueden expandir la piscina de células madre cancerosas, pero también generarán los tipos heterogéneos de células que constituyen la mayor parte del tumor. Las células madre cancerosas pueden ser relativamente refractarias a las terapias que se han desarrollado para erradicar las células que se dividen rápidamente que constituyen la mayor parte de un tumor. Las células madre cancerosas también pueden ser las células más probables a metastatizarse. Por lo tanto, la hipótesis de la célula madre cancerosa requeriría que replanteemos la forma para diagnosticar y tratar los tumores. La terapia tendría que dirigirse a la población de células madre "minoritarias" que alimenta el crecimiento del tumor y la metástasis, en lugar de la mayor parte del tumor. La hipótesis de la célula madre cancerosa está en el centro de un campo en rápida evolución y puede dictar cambios en la forma en que los investigadores básicos y clínicos ven el cáncer.

[0012] En la década de 1990, los estudios de John Dick y otros en la leucemia mielógena aguda (LMA) apoya la existencia de células madre cancerosas en esta enfermedad (15, 16). Los esfuerzos para definir la célula de origen en las neoplasias malignas hematopoyéticas fueron ayudadas por la disponibilidad de mapas de linaje hematopoyético, y de marcadores de superficie celular para distintos tipos de células y linajes. Se demostró que las células madre AML putativas eran capaces de regenerar la AML humana en ratones NOD/SCID irradiados. La célula madre AML mostró un fenotipo CD34⁺ CD38⁻, similar a la de progenitores hematopoyéticos humanos normales, lo que sugiere una estrecha similitud entre las células madre de AML y las células madre normales.

[0013] Recientemente, las células madre cancerosas también han sido identificadas en una serie de tumores sólidos. Clarke y sus colegas trasplantaron células fraccionadas de tumores de mama humanos en ratones NOD/SCID. Tan sólo un centenar CD44⁺CD24⁻/células bajas podrían establecer los tumores en los ratones, mientras que decenas de miles de células de diferentes fracciones no inducen tumores (17). Este ejemplo ha sido seguido por múltiples otros estudios sobre tumores sólidos. Por ejemplo, las células madre tumorales cerebrales que pueden producir tumores cerebrales trasplantables en serie en ratones NOD/SCID han sido aisladas de meduloblastomas humanos y glioblastomas utilizando el marcador CD133 encontrado también en células madre neurales normales (revisado en 18). La clasificación de las células de población lateral (SP) excluyendo el tinte de Hoechst y de CD44 permitió el aislamiento de células madre cancerosas en el cáncer de próstata (revisado en 19).

[0014] Existe cierta confusión en la literatura en cuanto a la definición de una célula madre cancerosa. Aquí, seguimos el consenso alcanzado en un taller reciente AACR (14), el cual establece que el cáncer de células madre "es una célula dentro de un tumor que posee la capacidad de auto-renovación y para hacer que los linajes heterogéneos de células cancerosas que componen el tumor. Las células madre cancerosas sólo pueden definirse experimentalmente por su capacidad para recapitular la generación de un tumor de crecimiento continuo". Los términos alternativos en la literatura incluyen la célula que inicia el tumor y la célula tumorigénica. Los ensayos para la actividad de las células madre cancerosas necesitan abordar el potencial de la autorrenovación y de la propagación del tumor. El ensayo de patrón-oro actualmente es xeno-transplante en serie en ratones inmunodeficientes.

[0015] Como un ejemplo no limitante de células madre cancerosas, las células madre cancerosas de colon se tratan

en más detalle.

Células madre cancerosas de colon

[0016] ¿Puede la hipótesis de las células madre cancerosas extrapolarse al cáncer de colon humano? Dos estudios muy recientes implican que este es el caso. John Dick y sus colegas exploraron la utilidad de CD133 como un marcador para las células de cáncer colorrectal (20). CD133 o prominina, es un marcador que se asocia con poblaciones madre y progenitoras en múltiples tejidos y cánceres. Se encontró que CD133 se expresó en 5-20% de las células de cáncer de colon humano. Los ensayos posteriores de xenoinjerto en serie demostraron que las células CD133+, pero no CD133-, podrían iniciar la formación de tumores en ratones inmunodeficientes. Se calculó que la frecuencia de células madre cancerosas en la población aislada de CD133+ era ligeramente inferior al 0,5%. De la misma manera, De Maria y otros encontraron que las células CD133+ comprendían menos del 2,5% de las células humanas de cáncer de colon y también demostraron que estas células podrían ser transplantadas en serie en ratones inmunodeficientes (21). Además, las células CD133+ se pueden mantener durante largos períodos de tiempo en cultivo utilizando un medio exento de suero que contiene EGF y FGF2.

[0017] Estos estudios implican que el cáncer de colon puede representar otro ejemplo de un tumor sólido en el que un pequeño número de células madre cancerosas es responsable del mantenimiento del tumor. La clasificación para la expresión del marcador CD133 enriquece significativamente para la célula madre cancerosa, pero la mezcla celular resultante es lejos de ser pura. Por lo tanto, no está claro cuáles son las propiedades exactas de las células madre cancerosas dentro de la preparación de células clasificadas, como su estado de ciclo celular, o su resistencia a la quimioterapia o a la radiación.

[0018] US 2004/0058392 y EP 1 400 807 describe una lista de genes diana TVC que se definieron en la línea celular de cáncer de colon LS174T (22). En las aplicaciones, se especuló que estas moléculas expresadas en células de cáncer de colon y en criptas intestinales representarían marcadores de células madre. Varios de los marcadores codifican las proteínas de la superficie celular. Los inventores de los documentos US 2004/0058392 y EP 1 400 807 contemplaron que estas proteínas pueden usarse como marcadores para la selección de la abundante población de células madre en el intestino. Sin embargo, resultó que la abrumadora mayoría de estas proteínas no son adecuadas como un marcador de selección de células madre, ya que no se expresan (específicamente) por células madre. Por ejemplo, la proteína CD44 se expresa por todas las células criptas divisorias (23) como lo es cMyb (24) y GPX2 (25). La proteína c-Kit se expresa en células entero-endocrinas no divisorias (26). EphB2 se expresa por todas las células en división y EphB3 se expresa por las células Paneth no divisorias (27). BMP4 se expresa por las células del estroma en la vellosidad (28). Y Claudina1 se expresa casi omnipresente (29).

[0019] La presente invención se refiere a marcadores que identifican las células adultas y/o madre de tejido y células madre cancerosas. Las células madre adultas y/o de tejido identificadas son útiles en la reparación de tejido dañado o enfermo. La presente invención se refiere además a métodos que permiten el aislamiento de células madre de adultos y/o tejidos y/o células madre cancerosas. La invención se refiere además a procedimientos *ex vivo* para el cultivo o mantenimiento o multiplicación (aislada) de adultos y/o células madre de tejidos y/o células madre cancerosas. La invención se refiere además a métodos que permiten la identificación y erradicación de marcadores de células madre cancerosas. Uno de los objetos de la presente invención es proporcionar nuevos marcadores que sean útiles en un método para identificar células madre adultas y células madre cancerosas. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método adecuado para mantener/cultivar/multiplicar/expandir células madre adultas. Otro objeto de la presente invención es erradicar células madre cancerosas. Las células madre adultas se aíslan típicamente de tejido y por lo tanto se denominan también células madre de tejido.

[0020] Los receptores de superficie Lgr5 y Lgr6 marcan las células madre adultas en múltiples tejidos, así como las células madre cancerosas en múltiples tipos de cáncer. Los presentes inventores revelan que los patrones de expresión de las moléculas superficiales Lgr5 (también conocidas como Grp49) y Lgr6 independientemente marcan células madre adultas en múltiples tejidos, así como células madre cancerosas en múltiples tipos de cáncer. Los receptores de la hormona glicoproteína, tales como los receptores de LH, FSH y TSH, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) grandes, pero son únicos en llevar un ectodominio rico en leucina importante para la unión a ligando. Estos receptores acoplados a proteína G ricos en leucina y que contiene repetición en el genoma humano se denominan LGRs. El análisis filogenético muestra que hay tres subgrupos LGR: los receptores conocidos de la hormona glicoproteica; LGR4 a 6; y un tercer subgrupo representado por LGR7 (30). Lgr5 y -6 son el objeto principal de esta invención. Los ligandos para estos dos receptores no se describen en la literatura científica; por lo tanto estos receptores se refieren a menudo como huérfanos. Las secuencias de los receptores humanos, de ratón y de rata se muestran en la Figura 10. El LGR4 humano comprende 951 aminoácidos, 447 de los cuales son idénticos a los aminoácidos correspondientes en Lgr5 y 485 de los cuales son idénticos a los aminoácidos correspondientes en LGR6. El Lgr5 humano comprende 907 aminoácidos, 387 de los cuales son idénticos a los aminoácidos correspondientes en LGR6. LGR6 consta de 967 aminoácidos. Una estructura predicha de estos receptores se da en la Figura 11. LGR4/GPR48 es el gen mejor estudiado de los tres. Según la literatura científica, se expresa ampliamente en múltiples tejidos (31, 32) y no se asocia específicamente con células madre. En modelos genéticos de ratón, se ha descrito que son importantes para el crecimiento intrauterino (32), para la fertilidad masculina (33) y para el desarrollo renal (34). Lgr5/GPR49 ha sido eliminado. Los embriones mutantes

mueren después del nacimiento debido a un defecto en la lengua y la mandíbula inferior (35). Lgr5/GPR49 está sobreexpresado en cánceres hepáticos y de colon (22, 36, 37). LGR6 no ha sido estudiado más allá de su clonación inicial y el análisis de secuencias (30).

5 RESUMEN DE LA INVENCION

[0021] La invención proporciona un método para obtener células madre Lgr5 + que comprenden la puesta en contacto de una suspensión de células aislada de una muestra de tejido u órgano normal o de una muestra de tumor sólido o líquido con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5; e identificar las células unidas a dicho compuesto de unión.

[0022] La invención también proporciona células madre Lgr5+ aisladas que se pueden obtener por un método de la invención, en el que la célula madre es un intestino, cerebro, hígado, retina, estómago, páncreas, ovario, médula adrenal, vejiga, hueso, tejido conectivo, oído, músculo, próstata, placenta, útero o células madre de mama.

[0023] La invención también proporciona una colección aislada de células madre que comprende más de 50% de células madre positivas Lgr5 en las que la célula madre es un intestino, cerebro, hígado, retina, estómago, páncreas, ovario, médula adrenal, vejiga, hueso, tejido conectivo, oído, músculo, próstata, placenta, útero o células madre de mama.

[0024] La invención también proporciona una célula madre aislada que comprende Lgr5 en su membrana celular, en la que la célula madre es un intestino, cerebro, hígado, retina, estómago, páncreas, ovario, médula adrenal, vejiga, hueso, tejido conectivo, oído, músculo, próstata, placenta, útero o células madre de mama.

[0025] La invención también proporciona una célula madre aislada o una colección de células madre, en la que la célula madre contiene compuesto específico de unión unido Lgr5, en el que dicho compuesto de unión Lgr5 es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo derivado o anticuerpo capaz de unión a Lgr5.

[0026] La invención también proporciona células madre cancerosas Lgr5+ aisladas obtenibles por un método de la invención.

[0027] La invención también proporciona células madre cancerosas aisladas que comprenden Lgr5 embebido en su membrana celular.

[0028] La invención también proporciona una colección de células madre cancerosas que comprenden Lgr5 incrustado en su membrana celular, en el que dicha recogida comprende al menos el 50% de células madre cancerosas capaces de recapitular la generación de un tumor de crecimiento continuo.

[0029] La invención también proporciona una colección de células madre de acuerdo con la invención, para uso en un método de tratamiento.

[0030] La invención también proporciona el uso de células madre de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para tratar el tejido dañado o enfermo.

[0031] La invención también proporciona una composición para uso en el tratamiento de daño en el tejido u órgano que comprende células madre de acuerdo con la invención, preferiblemente las células madre de tejido o de órganos.

[0032] La invención también proporciona un anticuerpo, derivado o fragmento que tiene afinidad por Lgr5, o un inhibidor de una transcripción Lgr5 ARNm, para su uso en el diagnóstico *in vivo* de la presencia y/o el contenido de las células madre cancerosas en un tumor.

[0033] La invención también proporciona un método para determinar si una muestra comprende una célula madre cancerosa, que comprende:

- Poner en contacto una suspensión de células aislada de un tejido normal, una muestra de órgano o una muestra de tumor sólido o líquido con un compuesto de unión, donde el compuesto de unión es un anticuerpo, derivado o fragmento del mismo que tiene afinidad por Lgr5;
- Eliminar el compuesto de unión no unido;
- Detectar cualquier complejo ligado; y
- Determinar la presencia de una célula madre cancerosa a partir de la presencia del complejo unido.

[0034] La invención también proporciona el uso de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo derivado o anticuerpo que tiene afinidad por Lgr5 para la identificación de células madre en o para el aislamiento de células madre a partir de una muestra de tejido u órgano

[0035] La invención también proporciona el uso de Lgr5 como un marcador para el aislamiento de células madre de tejido o de órganos de una muestra de tejido u órgano.

[0036] La invención también proporciona un método para mantener o cultivar células madre de tejido o de órganos según la invención, que comprende la proporción a las células madre de tejido o de órganos con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5.

[0037] La invención también proporciona el uso de células madre cancerosas aisladas de acuerdo con la invención en la identificación de compuestos que se pueden utilizar en el tratamiento de cáncer.

[0038] La invención también proporciona un método para poner a prueba el efecto de un compuesto posible de células madre contra el cáncer que comprende la puesta en contacto de una colección de células madre cancerosas de acuerdo con la invención in vitro con dicho posible compuesto de células madre contra el cáncer y examinar si dichas células madre cancerosas tratadas son capaces de generar un tumor de crecimiento continuo.

[0039] La invención también proporciona un método in vitro para determinar la efectividad de un tratamiento anti-cáncer, que comprende la determinación de la presencia de células madre cancerosas poniendo en contacto células de cáncer con un compuesto de unión Lgr5 in vitro antes y después del tratamiento contra el cáncer, en el que dicho compuesto de unión a Lgr5 es un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0040] En una primera forma de realización, la invención proporciona un método para obtener (o aislar) células madre Lgr5 + de adultos que comprende

- opcionalmente preparar una suspensión celular de una muestra normal de tejido u órgano
- poner en contacto una suspensión de células aislada de una muestra de tejido u órgano normal con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5
- identificar las células unidas a dicho compuesto aglutinante, y
- opcionalmente aislar las células madre de dicho compuesto aglutinante.

[0041] Un método de la invención permite la obtención (o aislamiento) de una colección de células que comprenden, preferiblemente que consiste en, al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente por lo menos 90% de células madre, tales como entre 90% y 99% de células madre o entre 95% y 99% de células madre.

[0042] En algunas realizaciones, la colección de aislados de células madre comprende, y preferiblemente consta de, más de 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferido al menos 90% de células madre, como entre 90% y 99% de células madre o entre 95% y 99% de células madre pluripotentes puras, que pueden retener un fenotipo indiferenciado. En algunas realizaciones, las células madre de la invención conservan las capacidades de mantenimiento autónomo a lo largo de la vida; y son capaces de regenerar el tejido pertinente después de la lesión. Sus descendientes, o células hijas no células madre pueden diferenciarse hacia todos los linajes presentes en el tejido pertinente. Dicha recogida de células puede aislarse a partir de una suspensión de células que comprende células madre y células hijas de células no madre tales como células progenitoras hijas comprometidas o diferenciadas. Una célula madre adulta es preferiblemente una célula madre obtenida a partir de un tejido embrionario posterior. Preferiblemente un tejido post natal. En primates tales como un ser humano, se obtienen preferiblemente sujetos con al menos un año de edad, preferiblemente un sujeto post-puberal. En una realización preferida de la invención, dichas células madre son células madre adultas y/o células madre cancerosas.

[0043] Una ventaja importante de una colección de células madre que comprenden más de 50% de células madre pluripotentes es que dicha población comprende menos células que pueden actuar negativamente sobre la capacidad de automantenimiento de las células madre y/o la capacidad de diferenciación de las células madre, En comparación con una colección de células madre que comprenden menos de 50% de células madre pluripotentes puras. Estas células de acción negativa comprenden células hija no de células madre u otras células no madre que se co-aislan con las células madre.

[0044] Otras ventajas de una población pura o casi pura de células madre adultas son que el número de células limitadas puede utilizarse como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades en las que se ha visto afectado el tejido correspondiente, del que la composición es bien conocida.

[0045] Preferiblemente, dichas células madre son células madre de tejido, como por ejemplo las células intestinales madre, células madre de la piel o las células madre de la retina. La invención proporciona preferiblemente un método para aislar células madre de tejido, comprendiendo dicho método las etapas descritas anteriormente. Dichas células madre no incluyen células madre embrionarias humanas. Cuando se aíslan células madre adultas y/o de

tejido, se prefiere comenzar con una colección de células del tejido específico del que se va a aislar el tejido y/o la célula madre de un adulto. Típicamente, una célula madre de tejido y/o una célula madre de un adulto se compromete a formar células de dicho tejido, sin embargo, se puede manipular excepcionalmente una célula madre de tejido y/o de un adulto para producir células de otro tejido.

[0046] Las células madre son células primitivas que se encuentran en todos los organismos multicelulares. Conservan la capacidad de renovarse a través de la división de células mitóticas y pueden diferenciarse en una amplia gama de tipos de células especializadas. Las tres grandes categorías de células madre de mamíferos son: células embrionarias (derivadas de blastocistos), células madre adultas (que se encuentran en tejidos adultos) y células madre de sangre de cordón (que se encuentran en el cordón umbilical). La definición de una célula madre requiere que sea al menos capaz de auto-renovación (la capacidad de atravesar numerosos ciclos de división celular manteniendo al mismo tiempo el estado indiferenciado) y tiene una potencia ilimitada (la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula madura, es decir, totipotente, pluripotente, multipotente o unipotente).

[0047] En una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre Lgr5+ que comprenden

- opcionalmente preparar una suspensión de células a partir de una muestra de tejido normal
- poner en contacto dicha suspensión de células aislada de una muestra de tejido u órgano normal con un anticuerpo, un derivado de anticuerpo fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto aglutinante, y
- opcionalmente aislar las células madre de dicho compuesto aglutinante, en el que dichas células madre son células madre adultas, más preferiblemente células madre adultas de mamífero e incluso más preferiblemente células madre adultas. Estas células madre adultas suelen actuar como un sistema de reparación para el cuerpo y reparan células especializadas. Las células madre adultas se encuentran tanto en los niños como en los adultos y la mayoría de las células madre adultas tienen restricciones de linaje (multipotentes) y se conocen por su origen tisular, por ejemplo, células madre de la piel o células madre de la retina.

[0048] Una muestra de tejido u órgano se puede obtener a través de cualquier método conocido, tal como una biopsia. Además, se puede obtener una muestra de tejido u órgano a partir de cualquier posible tejido u órgano, tal como, pero no limitado a, corazón, retina, mama, ovario, pulmón, cerebro, ojos, estómago, páncreas, hígado, intestino que comprende colon y tejido rectal, piel, folículo piloso y médula suprarrenal,

[0049] La frase "un tejido normal o muestra de órgano" se utiliza aquí para referirse a una muestra de tejido u órgano que es sano, no transformado, no maligno, no canceroso o no tumorigénico, es decir, una muestra de tejido o de órgano sano, no transformado, no malignante, no canceroso o no tumorigénico. Cualquier patólogo, experto en la técnica, puede determinar si un tejido es sano, no transformado, no maligno, no canceroso o no tumorigénico.

[0050] En una realización preferida, la muestra de tejido u órgano utilizado es de origen humano de mamífero. Aún más preferentemente, el tejido es tejido adulto (es decir, tejido de un mamífero transportado, es decir tejido no embrionario/fetal).

[0051] La médula ósea y la sangre (espinal) pueden considerarse suspensiones de células naturales. A partir de órganos sólidos, se pueden obtener suspensiones celulares por ejemplo por interrupción mecánica del tejido de órganos en pequeños fragmentos. Estos fragmentos pueden opcionalmente segregarse adicionalmente en células individuales mediante productos químicos tales como EDTA y/o por digestión enzimática con, por ejemplo, las preparaciones enzimáticas tripsina, dispasa, colagenasa o pancreatina. El procedimiento puede implicar el cultivo de tejidos o células antes, durante o después de los procedimientos de disrupción y/o digestión enzimática.

[0052] Como no siempre es necesario aislar las células madre del compuesto de unión utilizado, dicho paso se presenta como una característica opcional en la reivindicación. Cuando es necesario aislar las células madre del compuesto de unión a Lgr5 y/o 6, esto puede realizarse por múltiples métodos bien conocidos por el experto en la materia. Ejemplos adecuados son agitación (mecánica), digestión enzimática, adición de un compuesto de unión en exceso o un derivado del mismo, elución mediante cambio de concentración de pH o sal.

[0053] Ahora que los inventores han proporcionado pruebas de que Lgr5 o 6 son (únicos) marcadores de células madre, compuestos que son capaces de unirse a Lgr5 y/o 6 (es decir, compuestos de unión Lgr5 o 6) se pueden utilizar para identificar, marca y aislar las células madre.

[0054] Un ejemplo adecuado de un compuesto de unión Lgr5 o 6 es un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 o 6, es decir, un anticuerpo o un derivado o fragmento del mismo que tiene afinidad por Lgr5 o 6. Como Lgr5 y 6 son proteínas de superficie transmembrana, tal anticuerpo o un derivado o un fragmento del mismo tiene preferentemente afinidad por la parte de la proteína que se enfrenta externamente, es decir, se une a cualquier parte extracelular. En una realización preferida, dicho anticuerpo o un

derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo tiene una alta afinidad por Lgr5 y/o 6.

[0055] Por lo tanto, en una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre Lgr5+ que comprenden

- opcionalmente preparar una suspensión celular de una muestra normal de tejido u órgano
- poner en contacto una suspensión celular aislada de una muestra de tejido u órgano normal con un compuesto de unión Lgr5 y opcionalmente Lgr6
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto de unión
- opcionalmente aislar las células madre de dicho compuesto aglutinante,

En el que dicho compuesto de unión Lgr5 y opcionalmente Lgr6 es un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y opcionalmente Lgr6.

[0056] Los anticuerpos o sus derivados y/o sus fragmentos se pueden proporcionar por métodos que son bien conocidos para el experto en la técnica e incluyen la tecnología de hibridoma en ratones normales o transgénicos o en conejos, o la tecnología de anticuerpos de presentación en fagos. En una realización, se usa inmunización genética. Esta técnica comprende la administración de una secuencia de ácido nucleico, o un equivalente funcional de la misma, que codifica al menos un antígeno de interés, a un animal no humano. El (los) antígeno(s) codificado(s) está(n) producido(s) por el animal, que estimula el sistema inmune del animal contra dicho(s) antígeno(s). Por lo tanto, se produce una respuesta inmune contra dicho(s) antígeno(s) en dicho animal. Posteriormente, las células T, las células B y/o los anticuerpos específicos para un antígeno de interés se obtienen preferiblemente de dicho animal. Dichas células T, células B y/o anticuerpos son opcionalmente procesadas adicionalmente. En una realización preferida, se utiliza una célula B obtenida de interés en tecnología de hibridoma donde dicha célula B obtenida se fusiona con una célula tumoral para producir una célula productora de anticuerpos híbridos.

[0057] Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos adecuados son scFv, Fab, o (Fab)₂. Ejemplos de derivados adecuados son anticuerpos quiméricos, nanocorpos, anticuerpos bifuncionales o anticuerpos humanizados.

[0058] En aún otra realización preferida, el anticuerpo usado es un anticuerpo monoclonal.

[0059] En una realización preferida adicional, un compuesto de unión a Lgr5 y/o 6 comprende un anticuerpo o un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada como se representa en la Figura 27, y preferiblemente también comprende una molécula de cadena ligera de inmunoglobulina complementaria, por lo que las secuencias CDR se determinan según Kabat (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," US Dept. of Health and Human Services, National Institute of Health, 1987). Preferentemente, dicho derivado de anticuerpo o anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende la secuencia de CDR1 de cadena pesada y la secuencia de CDR2 de cadena pesada y la cadena pesada de secuencia CDR3 de una cadena pesada como se muestra en la Figura 27. Se encontró por los inventores que un anticuerpo o un anticuerpo derivado o un fragmento de anticuerpo, tal como, por ejemplo, un fragmento scFv, Fab, o (Fab)₂, que comprende una cadena pesada CDR1, CDR2 y/o la secuencia CDR3 como se muestra en la Figura 27 constituye un compuesto de unión de alta afinidad con una alta especificidad para sus proteínas diana.

[0060] En una realización preferida adicional, un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 comprende un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena ligera CDR1, CDR2 y/o CDR3 como se muestra en la Figura 27, y preferiblemente también comprende una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina complementaria, por lo que las secuencias de CDR se determinan de acuerdo con Kabat (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," US Dept. of Health and Human Services, National Institute of Health, 1987). Preferiblemente, dicho derivado de anticuerpo o anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende la secuencia de cadena ligera CDR1 y la secuencia de cadena ligera CDR2 y la secuencia de cadena ligera CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 27. Se encontró por los inventores que un anticuerpo o un anticuerpo derivado o un fragmento de anticuerpo, tal como, por ejemplo, un fragmento scFv, Fab, o (Fab)₂, que comprende una secuencia de cadena ligera CDR1, CDR2 y/o CDR3 como se muestra en la Figura 27 constituye un compuesto de unión de alta afinidad con una alta especificidad para sus proteínas diana.

[0061] En una realización preferida, un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 comprende un anticuerpo como se muestra en la Tabla 4 o 5.

[0062] Un método de acuerdo con la invención, en el que un anticuerpo tal como se representa en la Tabla 4 o 5 se utiliza es por lo tanto también proporciona la presente, así como un método de acuerdo con la invención, en el que se utiliza un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que comprende al menos una secuencia de CDR como se muestra en la Figura 27. Preferiblemente, dicho anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de CDR₁ y CDR₂ de una secuencia y una secuencia de CDR₃ de una cadena ligera y/o cadena pesada representada en la figura 27.

[0063] En una realización específica, que comprende un compuesto de unión a una cadena pesada y/o una cadena

ligera de secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 como se muestra en la Figura 27, es un anticuerpo monoclonal de rata. En una realización preferida, un compuesto de unión que comprende una cadena pesada y/o una secuencia de cadena ligera CDR1, CDR2 y/o CDR3 como se representa en la Figura 27, es un anticuerpo monoclonal quimérico, desimmunizado, o humanizado. Los métodos para generar un anticuerpo quimérico, desimmunizado, humanizado o monoclonal o derivado o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada y/o una cadena ligera CDR1, CDR2 y/o CDR3 como se representa en la Figura 27, son conocidas en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede ser generado que comprende una región variable de roedor que comprende la secuencia de CDR indicada fusionada a un no roedor, por ejemplo un ser humano, la región constante (Morrison et al 1984. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 81: 6851 a 6855). Los métodos para deimmunización de un compuesto de unión que comprenden una cadena ligera CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada de secuencia y/o como se representa en la Figura 27 también se conocen para un experto, por ejemplo de Giovannoni, 2003. Neurology 61: S13- S17. Humanización de un anticuerpo no humano se consigue principalmente a través de injerto de las regiones CDR de una región de entramado de inmunoglobulina humana tal como se muestra, por ejemplo, en US6548640, US5530101, y US5859205.

[0064] Un anticuerpo humano contra Lgr5 o 6 puede también ser generado en un animal provisto con secuencias humanas que codifican un gen de cadena pesada y/o cadena ligera de inmunoglobulina, tales como cepas transgénicas de ratones en los que se suprime la expresión de genes de anticuerpo de ratón y se sustituyó efectivamente con expresión de genes de anticuerpos humanos. Los ejemplos son proporcionados por la tecnología HuMAb®-Mouse de Medarex; la tecnología TC Mouse™ de Kirin, y la tecnología KM-Mouse®, un ratón cruzado que combina las características de HuMAb-Mouse con el TC Mouse.

[0065] La descripción describe además el uso de un compuesto de unión de acuerdo con la invención para la identificación o aislamiento de células madre a partir de una población de células que comprende células madre y células progenitoras hija comprometidas o diferenciadas; por lo que las células madre aisladas comprenden células madre pluripotentes puras al menos 50%.

[0066] Otro ejemplo de un compuesto de unión Lgr5 o 6 es un ligando Lgr5 o 6. Tal ligando Lgr5 o 6 se pueden utilizar sin modificar, se pueden producir y/o se utilizan como una proteína de fusión (es decir, una proteína de fusión de ligando) o se pueden acoplar a un segundo resto, por ejemplo, permitir la separación celular.

[0067] En una realización preferida, la divulgación, por tanto, describe un método para obtener (o aislar) las células madre que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto dicha suspensión de células con un compuesto de unión Lgr5 y/o 6
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto de unión
- opcionalmente aislar las células madre a partir de dicho compuesto de unión,

en el que dicho compuesto de unión Lgr5 y/o 6 es un ligando Lgr5 o 6, por ejemplo una proteína de fusión de ligando.

[0068] La persona experta en la técnica es capaz de producir una proteína de fusión de ligando Lgr5 o 6, por ejemplo a través de técnicas de biología molecular estándar.

[0069] Un ejemplo adecuado de un Ligando Lgr5 o 6 es un miembro de la familia de péptidos de la insulina, tales como InsI5 o relaxina3. Otro ejemplo adecuado es una cisteína proteína-nudo tales como noggin, gremlina1 o -2, Dan, o Cerberus. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de estos ligandos son conocidos y el experto en la materia es, pues, por ejemplo capaz de producir una proteína de fusión de ligando.

[0070] Preferiblemente, la segunda fracción de una proteína de fusión de ligando presenta una característica que permite una fácil identificación y localización de la proteína de fusión, por ejemplo una proteína (fragmento) tal como la cola de anticuerpo Fc o proteína estafilocócica A o glutatión-S-transferasa, una etiqueta corta de péptido antigénico como el Myc, FLAG o etiqueta HA o una etiqueta de histidina oligomérica, una etiqueta enzimática, tales como fosfatasa alcalina, un marcador de proteína fluorescente tal como la proteína verde fluorescente. Restos químicos pequeños también se pueden acoplar con el ligando para la identificación de células madre y/o aislamiento. Estos restos pueden ser reconocidos y unidos por anticuerpos específicos, o pueden tener afinidad específica para que se utilice un material en la separación de células, o puede ser por ejemplo fluorescente. En una realización aún más preferida, la segunda parte de la proteína de fusión se une a un ligando Lgr5 o 6 a través de un espaciador. Aún más preferible, dicho separador comprende una secuencia de digestión enzimática. Esto permite una fácil separación de la segunda fracción y el ligando Lgr5 o 6.

[0071] Sin embargo, otro ejemplo de un compuesto de unión Lgr5 o 6 es un pequeño compuesto que tiene afinidad por Lgr5 o 6.

[0072] En una realización preferida, la descripción de este modo se describe un método para obtener (o aislar)

células madre que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto dicha suspensión de células con un compuesto de unión Lgr5 y/o 6
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto de unión
- opcionalmente aislar las células madre a partir de dicho compuesto de unión,

en el que dicho compuesto de unión Lgr5 o 6 es una pequeña molécula con afinidad por Lgr5 o 6. Un ejemplo adecuado es una molécula química pequeña o una molécula no química pequeña o una pequeña proteína.

[0073] En una realización preferida, la afinidad de dicha molécula pequeña para Lgr5 o 6 es una alta afinidad, es decir, una afinidad con Kd de al menos 10^{-7} .

[0074] Como ya se ha señalado anteriormente, la invención proporciona un método para obtener células madre Lgr5+ que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tejido u órgano normal con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto de unión, y
- opcionalmente aislar las células madre a partir de dicho compuesto de unión,

en el que dichas células son preferiblemente células madre (adultas) (de tejido).

[0075] Los ejemplos no limitantes de células madre que se pueden obtener a través de los métodos mencionados anteriormente son piel, intestinal, comprendiendo células madre de colon y rectal, ojo, retina, cerebro, mama, folículo piloso, páncreas, estómago, hígado, pulmón, corazón, adrenal médula, o de ovario. No ha sido previamente posible obtener o aislar células madre de estómago, intestinales o de la retina. Por lo tanto, en una realización preferida, las células madre obtenidas o aisladas son células madre de estómago, intestinales o de la retina.

[0076] Dependiendo del adulto deseado y/o de células madre de tejido y la presencia o ausencia de Lgr5 y/o 6, un método de acuerdo con la invención se puede realizar con al menos uno, al menos dos, al menos tres o incluso más (diferentes) compuestos de unión. La Tabla 1 proporciona una visión general de la presencia o ausencia de Lgr5 o 6 en diferentes tipos de células madre de tejidos y/o adultas. Con base en la Tabla 1 la persona experta en la técnica es muy bien capaz de seleccionar uno o múltiples marcadores de destino y uno o múltiples compuestos de unión correspondientes y para obtener o aislar células madre de un tejido normal en particular o de órganos.

Tabla 1: La distribución de los marcadores de células madre adultas y/o de tejidos Lgr5 y 6

	marcador	
	Lgr5	Lgr6
célula madre		
cerebro	+	+
riñón	-	-
hígado	+	-
pulmón	-	+
retina	+	-
estómago	+	-
intestino	+	-
páncreas	+	-
testículo	-	-
pecho	+	+
folículo capilar	+	+
corazón	-	+
ovario	+	-
médula suprarrenal	+	-
piel	+	+
vejiga	+	-
hueso	+	-
tejido conectivo	+	+
oído	+	-
músculo	+	-

(continuación)

próstata	+	-
placenta	+	-
útero	+	+
médula ósea	-	+
ojo	-	+

[0077] Si la persona experta en la técnica quiere, por ejemplo, obtener células madre de mama, un compuesto de unión de Lgr5 o 6 puede ser utilizado solo o en cualquier combinación de los mismos, debido a que las células madre de mama comprenden ambos de dichos marcadores.

[0078] En una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre Lgr5+ que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tejido u órgano normal con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y opcionalmente un compuesto de unión Lgr6
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre a partir de dicho compuesto de unión,

donde

- dicho compuesto de unión Lgr5 y opcionalmente Lgr6 es un compuesto de unión Lgr5 y en el que dichas células madre son cerebro, hígado, retina, estómago, intestino, páncreas, ovario, folículo piloso, médula adrenal, piel, vejiga, hueso, oído, muscular, próstata, placenta o células madre mamarias; o
- dicho compuesto de unión Lgr5 y opcionalmente Lgr6 es al menos un compuesto de unión Lgr6 en combinación con el compuesto de unión Lgr5 en el que dichas células madre son cerebro, mama, piel, tejido conjuntivo, útero, o células madre del folículo piloso.

[0079] En otra realización más preferida, la descripción describe un método para obtener (o aislar) las células madre que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto dicha suspensión de células con un compuesto de unión Lgr5 y/o 6
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre a partir de dicho compuesto de unión,

en el que dicha célula madre es cualquiera de las células madre identificadas en la Tabla 1 y en el que el compuesto de unión Lgr5 y/o 6 utilizado corresponde a las células madre deseadas como se muestra en la Tabla 1, con la condición de que en caso de que la célula madre es intestinal o células de folículo del pelo, el Compuesto de unión Lgr5 o 6 no se dirigen únicamente a Lgr5 (es decir, no es un compuesto de unión Lgr5 solo).

[0080] En una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre Lgr5+ que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tejido u órgano normal con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión, y
- aislar, opcionalmente, las células madre a partir de dicho compuesto de unión,

en el que se utiliza un compuesto de unión.

[0081] En otra realización más preferida, la invención proporciona un método para obtener (o aislar) las células madre que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tejido u órgano normal con un derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y opcionalmente un compuesto de unión Lgr6
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión, y
- aislar, opcionalmente, las células madre a partir de dicho compuesto de unión,

en el que al menos dos compuestos de unión diferentes se ponen en contacto con dicha suspensión de células.

Dichos dos compuestos de unión diferentes pueden ser dirigidos contra uno y el mismo marcador (es decir, dirigidos a Lgr5). Por ejemplo se puede hacer uso de dos anticuerpos dirigidos a dos epítomos diferentes cuyos anticuerpos proporcionan en conjunto (una preferiblemente esencialmente completa) captura de las células madre deseadas. Sin embargo, dichos dos compuestos de unión diferentes también pueden ser dirigidos a dos marcadores de células madre diferentes (es decir, un compuesto de unión Lgr5 y uno para Lgr6). Cada vez que se hace uso de dos o tres o incluso más compuestos de unión, dichos compuestos de unión pueden ser de la misma clase de compuestos de unión (por ejemplo, todos los anticuerpos son moléculas pequeñas o proteínas de fusión ligando) o pueden ser de diferentes clases de compuestos de unión (por ejemplo, un anticuerpo dirigido a Lgr5 y una proteína de fusión de ligando para la unión a Lgr6).

[0082] En una realización preferida, al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr6 se ponen en contacto con una suspensión de células.

[0083] Después de permitir que los compuestos de unión interactúan con la suspensión de células (para una cierta cantidad de tiempo o bajo diferentes condiciones tales como pH, temperatura, sal, etc.), la posterior identificación de complejos unidos obtenidos se realiza. Esto por ejemplo se lleva a cabo por el uso de análisis de FACS. Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un tipo especializado de citometría de flujo. Se proporciona un método para la clasificación de una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula en un momento, en base a la dispersión de la luz específica y las características fluorescentes de cada célula. Es un instrumento científico útil, al proporcionar una grabación rápida, objetiva y cuantitativa de las señales fluorescentes a partir de células individuales, así como la separación física de las células de interés particular.

[0084] En una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener (o aislar) las células madre que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tejido u órgano normal con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión, y
- aislar, opcionalmente, las células madre a partir de dicho compuesto de unión,

en el que un FACS se utiliza para identificar y clasificar las células que se unen a dicho compuesto de unión.

[0085] Otras opciones para el aislamiento de células madre utiliza compuestos de unión unidos a Lgr5 sobre las células madre en relación con la clasificación por la magnética, separación de células por columna de inmutafinidad.

[0086] Para el análisis por FACS, el compuesto de unión está provisto de una etiqueta de fluorescencia, para su análisis por clasificación de perla magnética, el compuesto de unión se proporciona con perlas magnéticas (por ejemplo una perla magnética recubierta de anticuerpo), por inmutafinidad que se une a un soporte sólido, para la expansión de las placas de cultivo de tejidos.

[0087] Ahora que sabemos que Lgr5 y/o 6 son marcadores de células madre adultas, este conocimiento puede ser utilizado también en relación con el cultivo de células madre adultas. Los ligandos de Lgr5 y/o 6, así como pequeñas moléculas agonistas de Lgr5 y/o 6 se pueden utilizar como un estimulador para el crecimiento de células madre adultas normales (es decir, sanas, no transformadas, normales).

[0088] La invención por lo tanto también proporciona un método para mantener o cultivar células madre de tejido o de órganos, que comprende la proporción de células madre de tejidos o de órganos con un ligando Lgr5 o una pequeña agonista molécula de Lgr5, y opcionalmente un ligando Lgr6 o una pequeña agonista molécula de Lgr6, y en el que el ligando Lgr5 o pequeña agonista molécula es un fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo o anticuerpo capaz de unirse a Lgr5.

[0089] El término "mantenimiento" se utiliza aquí para describir la situación donde esencialmente no se cambia el número de células madre. El término "cultivo" se usa aquí para describir la situación donde se aumenta la cantidad de células madre, es decir, donde se expanden las células al tiempo que conserva su fenotipo de células madre.

[0090] Después de proporcionarse las células madre de tejidos u órganos con un ligando Lgr5 y opcionalmente un ligando Lgr6, las células se incuban en cultivo de tejidos en circunstancias (temperatura, medio de cultivo, pH) que permiten el mantenimiento o expansión.

[0091] Las células madre se pueden obtener a través de cualquier método adecuado, pero preferiblemente se obtienen por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, es decir, un método para obtener (o aislar) células madre que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tejido u órgano normal,
- poner en contacto dicha suspensión de células con un compuesto de unión Lgr5
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre a partir de dicho compuesto de unión.

[0092] En una realización preferida, la descripción describe un método para mantener o cultivar células madre de tejido o de órganos, que comprende la proporción células madre de tejido con un Lgr5 y/o 6 de ligando o una pequeña agonista molécula de Lgr5 y/o 6, en el que dicho ligando es un miembro de la familia de péptidos de insulina. Un ejemplo adecuado de un ligando Lgr5 o 6 es un miembro de la familia de péptidos de la insulina, tales como InsI5 o relaxina3. Otro ejemplo adecuado es una proteína de cisteína-nudo tales como Noggin, Gremlina 1 o 2, Dan, o Cerberus.

[0093] En algunas realizaciones, las células madre (aisladas), o una colección de células madre aisladas, preferiblemente de origen mamífero y aún más preferiblemente células madre humanas o células madre adultas humanas, en el que al menos el 50% de las células son Lgr5 o 6 positivas, células madre pluripotentes. Preferiblemente, al menos 60% de las células son Lgr5 o 6 positivos, células madre pluripotentes. Más preferiblemente, al menos 70% de las células son Lgr5 o 6 positivas, células madre pluripotentes. Más preferiblemente, al menos 80% de las células son Lgr5 o 6 positivas, células madre pluripotentes. Más preferiblemente, al menos 90% de las células son Lgr5 o 6 positivas, células madre pluripotentes. Lo más preferiblemente, al menos 95% de las células son Lgr5 o 6 positivas, células madre pluripotentes. La pureza de la colección se puede aumentar como se ha indicado anteriormente en este documento. En una realización preferida, la invención proporciona células madre (aisladas) o una colección de células madre aisladas en la que dichas células madre contienen compuesto unido Lgr5 de unión específico y opcionalmente compuesto de unión Lgr6, en el que el compuesto de unión Lgr5 específico es un anticuerpo de unión Lgr5 específico como se describe en el presente documento anteriormente o un fragmento o derivado del mismo, y el compuesto de unión Lgr6 opcional es opcionalmente un anticuerpo de unión Lgr6 específico como se describe anteriormente en este documento o un fragmento o derivado del mismo. La invención proporciona además un cultivo de células madre que comprende un anticuerpo de unión específico para Lgr5 y/o Lgr6 o un fragmento específico de al menos 20 aminoácidos de dicho anticuerpo de unión Lgr5 y/o Lgr6.

[0094] En una realización preferida, dichas células madre son, o dicho conjunto de células madre incluye, cerebro, hígado, retina, estómago, intestino incluyendo el colon y rectal, ovario, médula adrenal, vejiga, hueso, tejido conectivo, oído, músculo, células de la próstata, placenta, útero, de mama o madre que comprenden Lgr5 en su membrana celular.

[0095] También se describen células madre, o una colección de células madre que comprenden, cerebro, pulmón, piel, mama, folículo piloso, tejido conectivo, útero, médula ósea, ojos o células madre del corazón que comprenden Lgr6 en su membrana celular.

[0096] En una forma de realización preferida, dichas células madre son, o dicha colección de células madre comprende células madre de cerebro, mama, tejido o útero que comprenden Lgr5, así como Lgr6 en su membrana celular.

[0097] En otra realización más, la invención proporciona células madre, o una colección de células madre en el que al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de las células son Lgr5, las células madre positivas Lgr6 positivas y, opcionalmente, obtenible por un método según la invención, es decir,

- (i) un método para obtener células madre Lgr5+ y/o
- (ii) un método para mantener o cultivar células madre de tejido.

[0098] Las células madre, o la colección de células madre, aisladas de acuerdo con la invención se pueden usar como un agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades en las que se ha visto afectado el tejido correspondiente. Sin embargo, las células madre obtenidas son también muy útiles para otros fines.

[0099] En otra realización útil, la invención proporciona el uso de células madre, o una colección de células madre, tal como se obtiene por cualquiera de los métodos descritos aquí, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tejido dañado o enfermo.

[0100] Preferiblemente, dichas células madre son células madre humanas. Incluso más preferiblemente, el aceptor es humano también. La Tabla 2 proporciona una visión general de las diferentes células madre y las enfermedades en las que se pueden utilizar terapéuticamente.

Tabla 2. Las aplicaciones terapéuticas para uso de células madre Lgr5⁺ y/o Lgr6⁺

células madre	Aplicación terapéutica
cerebro	El daño cerebral tal como el infarto y la lesión cerebral traumática. Enfermedades degenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington
riñón	Insuficiencia renal crónica o aguda
hígado	Insuficiencia hepática crónica, por ejemplo debido a los daños por agentes infecciosos, productos químicos incluyendo el alcohol o trastornos metabólicos
pulmón	EPOC, fibrosis
retina	Ceguera y degradaciones de visión debidas a defectos en la retina
estómago	Anemia perniciosa
Intestinal, colon, rectal y colorrectal	Enfermedad de Crohn, daños en el tejido, resultante de quimioterapia u otros agentes tóxicos,
páncreas	Diabetes
testículo	Esterilidad
mama	Reconstrucción mamaria
corazón	Enfermedades del corazón como la insuficiencia cardíaca congestiva
ovario	Esterilidad
Médula suprarrenal	Enfermedad de Addison

[0101] Por lo tanto, la invención proporciona un uso de células madre, o una colección de células madre, tal como se obtiene por cualquiera de los métodos descritos aquí, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tejidos dañados o enfermos,

- en el que dichas células madre son células madre intestinales y en el que dicho tejido es el daño al epitelio intestinal, daño al hígado o daños en el páncreas o
- en el que dichas células madre son células madre de la retina y en el que el daño tisular es retina dañada; este enfoque es útil en el tratamiento de la ceguera debida a defectos en la retina; o
- en el que dichas células madre son células madre del cerebro; o
- en el que dichas células madre son células madre de mama; o
- en el que dichas células madre son células madre de estómago; o
- en el que dichas células madre son células madre del hígado; o
- en el que dichas células madre son células madre de ovario; o
- en el que dichas células madre son células de cualquiera de las mencionadas en la Tabla 2 y la enfermedad a tratar, se menciona como la aplicación terapéutica correspondiente en el cuadro 2, por ejemplo, las células madre son células madre de la retina y la enfermedad es ceguera debida a defectos en la retina.

[0102] La terapia génica, además, puede utilizarse en un método dirigido a la reparación de tejido dañado o enfermo. El uso puede, por ejemplo, estar hecho de un vehículo de suministro de genes adenovirales o retrovirales para entregar la información genética (como el ADN y/o ARN) a las células madre. Un experto en la materia puede reemplazar o reparar determinados genes específicos en la terapia génica. Por ejemplo, un gen normal se puede insertar en una ubicación específica dentro del genoma para reemplazar un gen no funcional. Este enfoque es común. En otro ejemplo, un gen anormal podría ser cambiado por un gen normal a través de recombinación homóloga o un gen anormal podría ser reparado a través de mutación inversa selectiva, que devuelve el gen a su función normal. Un ejemplo adicional está alterando la regulación (el grado en que un gen está encendido o apagado) de un gen particular. Preferiblemente, las células madre ex vivo son tratadas por un enfoque de la terapia de genes y se transfieren posteriormente al mamífero (preferiblemente un ser humano) en necesidad de tratamiento.

[0103] Por lo tanto, la invención también proporciona un método para modificar una secuencia genómica de una célula madre, que comprende la proporción de una colección de células madre de acuerdo con un método de la invención, contactando dicha colección con un ácido nucleico para modificar una secuencia genómica, y el aislamiento de una célula madre en el que una secuencia genómica ha sido modificada. La invención proporciona además un método para modificar una secuencia genómica de una célula de tejido que comprende la proporción de una colección de células de tejido *in vitro* con una secuencia de ácido nucleico para la modificación de dicha secuencia genómica, que comprende además el aislamiento de una célula madre a partir de dicha colección de células de tejido de acuerdo con un método de la invención.

[0104] La invención proporciona además, células madre genómicamente modificadas aisladas que pueden obtenerse por un método de la invención, y donde al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de las células son células madre pluripotentes que pueden retener un fenotipo indiferenciado. La invención proporciona además, células madre genómicamente modificadas aisladas que pueden obtenerse por un método de la invención, y donde al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de las células son células adultas y/o madre de tejido como se define aquí.

[0105] En otra realización útil, la invención proporciona el uso de células madre como se obtiene mediante cualquiera de los métodos descritos aquí, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tejido dañado o enfermo, que comprende además modificar genéticamente dichas células madre preferiblemente *ex vivo* y/o preferiblemente por un enfoque de terapia génica. La invención proporciona además una composición para el tratamiento de daño en el tejido u órgano que comprende células madre aisladas genómicamente modificadas de acuerdo con la invención.

[0106] En aún una realización alternativa, la invención proporciona una composición para el tratamiento del daño de tejido que comprende células madre de tejido puede obtenerse mediante un método de acuerdo con la invención, es decir,

- (i) un método para obtener células madre Lgr5+, y/o
- (ii) un método para mantener o cultivar células madre de tejido.

[0107] Las células madre de la invención son también muy útiles para fines de investigación. Ejemplos de fines de investigación adecuados son aún más la identificación de marcadores de células madre o el desarrollo de la terapia génica con las células madre de la invención como una diana o cualquier otro propósito de la investigación.

[0108] La descripción describe además un uso de Lgr5 y/o 6 como un marcador para el aislamiento de células madre de tejido, así como el uso de un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 para el aislamiento de células madre de tejido.

[0109] La invención proporciona además una colección de células madre de acuerdo con la invención para uso en un método para tratar a un individuo en necesidad del mismo que comprende la administración a dicho individuo de una cantidad suficiente de células madre.

[0110] La descripción describe además un animal recombinante que comprende un primer gen reportero bajo control de un promotor Lgr5 o Lgr6 tal que el producto del gen informador se expresa en células que expresan Lgr5 o Lgr6, una secuencia que codifica una proteína regulable estando en un enlace operable con el primer gen informador tal que la proteína regulable se co-exprea con el primer producto del gen informador en células que expresan Lgr5 o Lgr6, y un segundo gen indicador que se expresa tras la activación de la proteína regulable.

[0111] Un animal recombinante permite la tinción de células madre de tejido o de órganos con dicho primer reportero, y permite la tinción de células hija no de células madre tales como las células hija progenitoras comprometidas o diferenciados con el segundo producto del gen indicador después de la activación de la proteína regulable.

[0112] El gen reportero es un gen que codifica un producto que puede ser fácilmente ensayado. Los genes indicadores se usan típicamente para determinar si una construcción de ácido nucleico particular se ha introducido con éxito en una célula, órgano o tejido y/o para detectar específicamente la célula donde se ha introducido el gen indicador y se expresa. El producto de expresión es típicamente único en el sentido de que las células no modificadas o células que no expresan el gen indicador no se detectan específicamente. Un gen informador también se refiere como un gen marcador. Cuando se utilizan dos o más genes indicadores, los diferentes genes indicadores no son normalmente iguales, en el sentido de que sus productos de expresión pueden ser fácilmente distinguidos unos de otros. Así, un primer y un segundo gen indicador típicamente no son los mismos. Una proteína regulable como se usa aquí es una proteína que, en la presencia de una señal, altera su función. Muchas proteínas diferentes regulables se han identificado y/o generadas artificialmente. Un ejemplo bien conocido es el sistema de tet-represor donde la presencia o ausencia de tetraciclina o un análogo del mismo regula la actividad de tet-operón mediante la regulación de la capacidad de unión de la proteína tet-represora a la secuencia de unión tet-represora. En este ejemplo la proteína tet-represora es la proteína regulable y la presencia o ausencia de tetraciclina es la señal. Aunque el sistema de tet-represor es bien conocido, existen muchas otras proteínas regulables.

[0113] Co expresión de dos o más proteínas en una célula es actualmente muy común. Las proteínas de fusión se pueden generar. Preferiblemente se usa un multi-cistrón. Esto se logra actualmente típicamente usando al menos un así llamado sitio de entrada ribosomal interno (IRES). Los métodos alternativos incluyen el uso de sitios de reiniciación y/o corte y empalme alternativo de un ARN que contiene dos o más marcos de lectura abiertos.

[0114] La descripción también describe una célula madre recombinante que comprende un primer gen reportero bajo control de un promotor Lgr5 o Lgr6 tal que el producto del gen informador se expresa en células que expresan Lgr5 o Lgr6, una secuencia que codifica una proteína regulable está en un enlace operable con el primer gen informador tal que la proteína regulable se co-expresa con el primer producto del gen informador en células que expresan Lgr5 o Lgr6, y un segundo gen indicador que se expresa tras la activación de la proteína regulable.

[0115] Dicha célula madre puede ser generada a partir de una célula madre aislada, o preferiblemente se aísla de un animal recombinante.

[0116] Dicha proteína regulable preferiblemente es CRE-ERT2, que puede ser activada mediante la administración de un estrógeno o análogo del mismo, tales como el tamoxifeno o 4-hidroxitamoxifeno. En esta realización preferida, la expresión del segundo gen informador es regulada por CRE-ERT2 activado a través de la eliminación de una secuencia de represor que evita la expresión del segundo gen reportero en el estado inactivo. Dicho primer producto de gen reportero puede ser una proteína fluorescente tal como la proteína verde fluorescente, o la proteína verde fluorescente más preferida. En una realización preferida adicional, dicho segundo gen reportero comprende LacZ, que codifica beta-galactosidasa que puede identificarse mediante la provisión de un sustrato adecuado tal como X-gal. Dicho segundo gen reportero se inserta preferiblemente en una región genómica que proporciona robusta expresión, prolongada del transgén después de la activación, tal como el locus ROSA si el animal transgénico es un ratón.

[0117] La descripción describe un animal recombinante que comprende los ácidos nucleicos tal como se especifica en los ejemplos en el contexto del animal recombinante para el rastreo de las células madre descritas.

[0118] Dicho animal recombinante es preferiblemente un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un roedor. Más preferiblemente una rata o un ratón.

[0119] La descripción describe además el uso de un animal recombinante o una célula madre recombinante para el rastreo de las células madre y los descendientes de una célula madre.

[0120] La descripción también describe un método para la identificación de los descendientes de una célula madre, que comprende la proporción de un animal recombinante o de células madre recombinante, la activación de la proteína regulable, y la identificación de las células que no expresan Lgr5 y/o 6 y el primer reportero, y expresan la segunda proteína reportera.

[0121] Los presentes inventores describen que la expresión de Lgr5 (también conocido como Grp49), así como la expresión de Lgr6 no sólo marcan las células madre adultas, pero también marcan las células madre cancerosas en múltiples tumores diferentes.

[0122] En otra realización más, la invención proporciona un método para obtener células madre cancerosas Lgr5+ que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tumor sólido o líquido con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5
- la identificación de las células unidas a dicho compuesto de unión; y
- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto de unión.

[0123] Preferiblemente, dichas células madre cancerosas están involucradas en el cáncer intestinal, incluyendo cáncer de colon, rectal y colorrectal, cáncer de piel tal como el carcinoma de células basales, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de próstata, el meduloblastoma y otros cánceres de cerebro, cáncer de hígado, cáncer de estómago, retina, cáncer de cabeza y cuello, cáncer testicular, folículo piloso, cáncer de ovario, cáncer adrenal medulla (feocromocitoma) o cáncer de pulmón. Por lo tanto, en una realización preferida, dichas células madre cancerosas son células madre cancerosas intestinales, incluyendo las células madre cancerosas de colon, rectal y colorrectal, células madre cancerosas de piel, tales como las células basales. El carcinoma de células madre, células madre cancerosas de esófago, células madre cancerosas de mama, las células madre cancerosas de próstata, las células madre de meduloblastoma y otras células madre cancerosas de cerebro, células madre cancerosas de hígado, células madre cancerosas de estómago, las células madre de la retina, las células madre de cáncer de cabeza y cuello, células madre cancerosas testiculares, cáncer de células madre del folículo piloso, células madre de cáncer de ovario, células madre de feocromocitoma, o células madre cancerosas de pulmón.

[0124] Como se ha mencionado, hay cierta confusión en la literatura en cuanto a la definición de una célula madre cancerosa. En este documento, seguimos el consenso alcanzado en un taller reciente AACR (14), que establece que el cáncer de células madre "es una célula dentro de un tumor que posee la capacidad de auto-renovación y para causar los linajes heterogéneos de células cancerosas que componen células madre cancerosas de tumor. Sólo así puede definirse experimentalmente por su capacidad para recapitular la generación de un tumor en continuo crecimiento". Los términos alternativos en la literatura incluyen células iniciadoras de tumores y células

tumorigénicas. Los ensayos para la actividad de las células madre cancerosas necesitan preferentemente abordar el potencial de auto-renovación y la propagación del tumor. El ensayo de patrón oro actualmente es de serie xenotrasplante en ratones inmunodeficientes.

[0125] Una muestra de tumor sólido es, por ejemplo obtenida a través de la biopsia o técnicas quirúrgicas y una muestra de tumor líquido es por ejemplo obtenida a partir de una sangre, orina, líquido cefalorraquídeo o una muestra de linfa de un mamífero, preferiblemente un ser humano

[0126] El tejido u órgano del que se toman muestras es por ejemplo el colon, mama, próstata, cerebro, hígado, estómago o pulmón.

[0127] Para obtener información con respecto a Lgr5 o 6, las partes anteriores de esta aplicación pueden ser consideradas.

[0128] En una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre cancerosas Lgr5+, o una colección de las células madre cancerosas, que comprende

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tumor sólido o líquido con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5
- la identificación de las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto de unión, en el que dichas células madre cancerosas son de mamífero, preferiblemente humanas, células madre cancerosas, y en el que la recogida de células madre cancerosas comprende al menos 50% células madre cancerosas, que son capaces de recapitular la generación de un tumor en continuo crecimiento. En una realización preferida, dicha colección de células madre cancerosas comprende al menos 60% células madre cancerosas, preferiblemente al menos 70% de células madre cancerosas, más preferiblemente 80% células madre cancerosas, más preferiblemente 90% células madre cancerosas, más preferiblemente 95% células madre cancerosas que son capaces de recapitular la generación de un tumor en continuo crecimiento.

[0129] La médula ósea y la sangre (espinal) pueden considerarse suspensiones de células naturales. De los tumores sólidos, las suspensiones de células se pueden obtener por ejemplo mediante la rotura mecánica de tejidos de órganos en pequeños fragmentos. Estos fragmentos pueden después opcionalmente estar más segregados en células individuales por los productos químicos tales como EDTA y/o por digestión enzimática con, por ejemplo, las preparaciones de enzima dispasa, colagenasa o pancreatina. El procedimiento puede implicar tejido o cultivo de células antes, durante o después de la interrupción y/o procedimientos de digestión enzimática.

[0130] Cuando una suspensión celular ya está disponible este paso del método se puede omitir (característica opcional).

[0131] Como no siempre es necesario aislar las células madre cancerosas a partir del compuesto de unión utilizado, dicho paso se presenta como una característica opcional. Cuando es necesario aislar las células madre cancerosas del compuesto de unión Lgr5 o 6, esto se puede realizar por varios métodos bien conocidos por personas expertas. Ejemplos adecuados son agitación (mecánica), digestión enzimática, adición de exceso de compuesto de unión o un derivado del mismo, delución por cambio de pH o concentración de sal.

[0132] Ahora que los inventores han demostrado que Lgr5 o 6 son marcadores de células madre cancerosas, los compuestos que son capaces de unirse a Lgr5 o 6 (es decir, compuestos de unión Lgr5 o 6) se pueden utilizar para identificar, marcar y aislar las células madre cancerosas .

[0133] Un ejemplo adecuado de un compuesto de unión Lgr5 o 6 es un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 o 6, es decir, un anticuerpo o un derivado o fragmento del mismo que tiene afinidad por Lgr5 o 6. Como Lgr5 y 6 son proteínas de superficie transmembranas, un anticuerpo tal o un derivado o un fragmento que tiene preferiblemente afinidad por la parte de la proteína que se orienta externamente, es decir, se une a cualquier parte extracelular de dicha proteína.

[0134] En una realización preferida, dicho anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo tiene una alta afinidad por Lgr5 y/o 6, es decir, una afinidad con una Kd de al menos 10^{-7} . Preferiblemente, la afinidad es $\leq 10^{-9}$. Sin embargo, afinidades de alrededor de 10^{-8} también se pueden utilizar.

[0135] Por lo tanto, en una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre cancerosas Lgr5+ que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto una suspensión celular con un compuesto de unión Lgr5 y opcionalmente Lgr6
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión

- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto de unión, en el que dicho compuesto de unión Lgr5 y Lgr6 es un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 o 6.

5 **[0136]** Los anticuerpos o sus derivados o sus fragmentos se pueden proporcionar por métodos que son bien conocidos para el experto en la técnica e incluyen la técnica del hibridoma, única cadena de anticuerpos/tecnología de visualización de fagos.

10 **[0137]** Como ejemplos no limitantes, la parte experimental describe anticuerpos Lgr5-específicos y Lgr6-específicos. Un método de acuerdo con la invención, en el que un anticuerpo tal como se representa en la Tabla 4 o 5, se proporciona por lo tanto también en el presente documento, así como un método de acuerdo con la invención, en el que un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo se utiliza que comprende al menos una secuencia CDR tal como se representa en la Figura 27. Preferiblemente, dicho anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de CDR1 y CDR2 de una secuencia y una secuencia de CDR3 de una cadena ligera y/o cadena pesada representada en la Figura 27.

15 **[0138]** Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos adecuados son scFv, Fab. Ejemplos de derivados adecuados son IES quiméricos anticuerpos, nanocuerpos, anticuerpos bifuncionales o anticuerpos humanizados. En aún otra realización preferida, el anticuerpo utilizado es un anticuerpo monoclonal.

20 **[0139]** Otro ejemplo de un compuesto de unión Lgr5 o 6 de la divulgación es un ligando Lgr5 o 6 que se puede utilizar sin modificar, pero también pueden producirse y/o emplearse como proteína de fusión o puede acoplarse a un segundo resto para permitir separación de células.

25 **[0140]** La divulgación, por tanto, describe un método para obtener (o aislar) células madre cancerosas que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto dicha suspensión de células con un compuesto de unión Lgr5 y/o 6
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto de unión, en el que dicho compuesto de unión Lgr5 o 6 es un Ligando Lgr5 o 6.

35 **[0141]** La persona experta en la técnica es muy bien capaz de producir una proteína de fusión de ligando LGR5 o 6, por ejemplo a través de técnicas de biología molecular estándar.

40 **[0142]** Un ejemplo adecuado de un Ligando Lgr5 o 6 es un miembro de la familia de péptidos de la insulina, tales como InsI5 o relaxina3. Otro ejemplo adecuado es una proteína-cisteína-nudo tales como Noggin, Gremlina, Dan, o Cerberus. Basándose en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos conocidos y publicados de estos ligandos, la preparación de una proteína de fusión está dentro de las capacidades de la persona experta en la técnica.

45 **[0143]** Preferiblemente, el segundo resto presenta una característica que permite una fácil identificación y localización de la proteína de fusión, por ejemplo una proteína (fragmento) tal como la cola de anticuerpo Fc o proteína estafilocócica A o glutatión-S-transferasa, una etiqueta de péptido antigénico corto tal como etiqueta Myc, FLAG o HA o una etiqueta de histidina oligomérica, una etiqueta enzimática, tales como fosfatasa alcalina, una etiqueta de proteínas fluorescentes (como la proteína verde fluorescente). Restos químicos pequeños también se pueden acoplar con el ligando para la identificación y/o aislamiento de células madre cancerosas. Estos restos pueden ser reconocidos y unidos por anticuerpos específicos, o pueden tener afinidad específica para un material para ser utilizado en la separación de células, o puede ser por ejemplo propiedades fluorescentes, radiactivas o magnéticas. En una realización aún más preferida, la segunda parte de la proteína de fusión se une a dicho ligando Lgr5 o 6 a través de un espaciador. Aún más preferible, dicho separador comprende una secuencia de digestión enzimática. Esto permite una fácil separación de la segunda fracción y el ligando Lgr5 o 6.

50 **[0144]** Sin embargo, otro ejemplo de un compuesto de unión Lgr5 o 6 es un pequeño compuesto que tiene afinidad por Lgr5 o 6.

55 **[0145]** La divulgación de este modo se describe un método para obtener (o aislar) células madre cancerosas que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto dicha suspensión de células con un compuesto de unión Lgr5 y/o 6
- identificar u obtener las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto de unión, en el que dicho compuesto de unión Lgr5 y/o 6 una pequeña molécula con afinidad por Lgr5 y/o 6. Dicha molécula pequeña es por ejemplo un péptido sintético o un compuesto químico pequeño.

[0146] En una realización preferida, la afinidad de dicha molécula pequeña para Lgr5 o 6 es un alto, es decir, una afinidad con una K_d de al menos 10^{-7} .

[0147] Tal molécula pequeña está acoplada opcionalmente a un segundo resto que presenta una característica que permite una fácil identificación y localización de la proteína de fusión, por ejemplo una proteína (fragmento) tal como la cola de anticuerpo Fc o proteína de estafilococos A o glutatión-S-transferasa, una etiqueta de péptido antigénico corto como la etiqueta de Myc, FLAG o HA o una etiqueta de histidina oligomérica, una etiqueta enzimática tal como la fosfatasa alcalina, un marcador de proteína fluorescente tal como la proteína fluorescente verde).

[0148] Dependiendo de la célula madre cancerosa deseada y la presencia ahora conocida o ausencia de Lgr5 o 6, un método de acuerdo con la invención puede utilizar al menos uno, al menos dos, al menos tres o incluso más compuestos de unión (diferentes). La Tabla 3 proporciona una visión general de la presencia o ausencia de Lgr5 o 6 en los diferentes tipos de tumores. Con base en esta Tabla por el experto en la técnica es muy bien capaz de seleccionar uno o múltiples marcadores de destino y uno o múltiples compuestos de unión correspondientes y por lo tanto capaces de obtener o aislar células madre cancerosas.

Tabla 3: La distribución de los marcadores de células madre Lgr5 y 6 en los tumores. Los datos se derivan de la comparación de expresión de Lgr5 o Lgr6 en tejidos normales frente a tumorales por el análisis de microarrays (GeneLogic) o por PCR cuantitativa.

	Marcador	
	LGR5	Lgr6
Células madre cancerosas		
cerebro	+	+
riñón	-	-
hígado	+	-
pulmón	-	+
retina	+	-
estómago	+	-
Colon/recto	+	+
cabeza y cuello	+	+
testículo	+	+
mama	+	+
folículo capilar	+	+
próstata	+	+
ovario	+	+
piel	+	+
leucemia	+	-
condrosarcoma	+	+
músculo/tejido blando	+	-
útero	+	+
retinoblastoma	-	+

[0149] Si la persona experta en la técnica quiere obtener células madre cancerosas de mama, un compuesto de unión de Lgr5 o 6 se puede utilizar solo o en cualquier combinación de los mismos, debido a que las células madre cancerosas de mama comprenden ambos de dichos marcadores.

[0150] En una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre cancerosas Lgr5+ que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tumor sólido o líquido con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y opcionalmente un compuesto de unión Lgr6
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto de unión,

donde

- dicho compuesto de unión Lgr5 o 6 es un compuesto de unión Lgr5 y en el que dichas células madre cancerosas son cerebro, hígado, retina, estómago, colon, cabeza y/o cuello, testículo, próstata, ovario, piel, folículo piloso, leucemia, condrosarcoma, músculo/tejido blando, células del útero, de mama o células madre no alcohólicas; o

- dicho compuesto de unión Lgr5 o 6 es al menos un compuesto de unión Lgr6 en combinación con al menos un compuesto de unión Lgr5 y en el que dichas células madre cancerosas son cerebro, piel, cabeza y/o cuello, testículo, mama, próstata, ovario, condrosarcoma, útero, o células madre del folículo piloso.

5 **[0151]** En una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre cancerosas Lgr5+ que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tumor sólido o líquido con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y opcionalmente un compuesto de unión Lgr6
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto de unión, en el que se utiliza un compuesto de unión.

15 **[0152]** En otra realización más preferida, la invención proporciona un método para obtener (o aislar) células madre cancerosas que comprenden

- preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tumor sólido o líquido con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y opcionalmente un compuesto de unión Lgr6
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto, en el que al menos dos compuestos de unión diferentes se ponen en contacto con dicha suspensión de células. Dichos dos compuestos de unión diferentes pueden ser dirigidos contra uno y el mismo marcador (dirigidos a Lgr5). Por ejemplo, se puede hacer uso de dos anticuerpos dirigidos a dos epítomos cuyos anticuerpos en conjunto proporcionan una captura (preferiblemente esencialmente completa) de las células madre deseadas. Sin embargo, dichos dos compuestos de unión diferentes también pueden ser dirigidos a dos marcadores de células madre diferentes (por ejemplo a Lgr6 y Lgr5). Cada vez que se hace uso de dos o tres o incluso más compuestos de unión, dichos compuestos de unión pueden ser de la misma clase de compuestos de unión (por ejemplo, todos los anticuerpos son, moléculas pequeñas o ligando (proteínas de fusión)) o puede ser de diferentes clases de compuestos de unión (por ejemplo un anticuerpo dirigido a Lgr5 y una proteína de fusión de ligando para la unión a Lgr6).

35 **[0153]** En una realización preferida, al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr6 ponen en contacto con una suspensión de células.

40 **[0154]** Después de dejar que los compuestos de unión interactúan con la suspensión de células (para una cierta cantidad de tiempo o bajo diferentes condiciones tales como pH, temperatura, sal, etc.), la posterior identificación de los complejos unidos obtenidos se realiza. Esto, por ejemplo, se lleva a cabo por el uso de análisis de FACS. Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un tipo especializado de citometría de flujo. Se proporciona un método para la clasificación de una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula tras otra, en base a la dispersión de la luz específica y las características fluorescentes de cada célula. Es un instrumento científico útil, ya que proporciona una grabación rápida, objetiva y cuantitativa de las señales fluorescentes a partir de células individuales, así como la separación física de las células de interés particular.

50 **[0155]** En una realización preferida, la invención proporciona un método para obtener células madre cancerosas Lgr5+, o una colección de células madre cancerosas Lgr5+, que comprende

- Preparar, opcionalmente, una suspensión de células de una muestra de tumor sólido o líquido
- poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tumor sólido o líquido con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y opcionalmente un compuesto de unión Lgr6
- identificar las células unidas a dicho compuesto de unión
- aislar, opcionalmente, las células madre cancerosas de dicho compuesto de unión, en el que un FACS se utiliza para identificar y clasificar las células que se unen a un Compuesto de unión Lgr5 y/o 6, y en el que dicha colección comprende al menos 50% de las células madre cancerosas que son capaces de recapitular la generación de un tumor en continuo crecimiento. Preferiblemente, dicha colección comprende al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de las células madre cancerosas que son capaces de recapitular la generación de una en continuo crecimiento tumoral.

[0156] Otras opciones para la identificación de los complejos unidos son la clasificación magnética de perlas, separación celular de columna de (inmuno)afinidad, o paneo de (inmuno)afinidad.

[0157] Para el análisis por FACS, el compuesto de unión está provisto preferiblemente de una etiqueta de fluorescencia, para su análisis por clasificación de perla magnética el compuesto de unión está provisto preferiblemente de perlas magnéticas (por ejemplo una perla magnética recubierta de anticuerpos).

[0158] En otra realización más, la invención proporciona (una colección de) células madre cancerosas que comprenden Lgr5 y Lgr6 opcionalmente integradas en su membrana celular, en la que dicha colección comprende al menos 50% de las células madre cancerosas que son capaces de recapitular la generación de un tumor en continuo crecimiento. En una realización preferida, dicha colección comprende células madre cancerosas puras de al menos 60%, preferiblemente células madre cancerosas puras al menos 70%, más preferiblemente células madre cancerosas puras al menos 80%, más preferiblemente células madre cancerosas puras al menos 90%, más preferiblemente al menos células madre cancerosas puras 95%. Más preferiblemente dicha colección se compone de células madre (cancerosas) con la pureza indicada. Tal colección de células madre cancerosas es por ejemplo obtenida por un método como se describe aquí, es decir, un método para obtener células madre cancerosas Lgr5+.

[0159] Los ejemplos de células madre cancerosas que se pueden obtener a través de los métodos mencionados anteriormente son células madre cancerosas de colon, recto, intestino, piel, retina, cerebro, mama, testículo, folículo piloso, de estómago, de cabeza y/o cuello, hígado, pulmón, próstata, esófago, médula adrenal, corazón o de ovario.

[0160] Si es necesario, dichas células madre cancerosas se mantienen o se multiplican (se expanden) por cultivo de dichas células en presencia de un Ligando Lgr5 y/o 6 bajo condiciones ambientales apropiadas (por ejemplo pH y temperatura). Un ejemplo adecuado de un ligando Lgr5 o 6 es un miembro de la familia de péptidos de la insulina, tales como InsI5 o relaxina3. Otro ejemplo adecuado es una proteína-cisteína-nudo tales como Noggin, Gremlina, Dan, o Cerberus.

[0161] Por lo tanto, en otra realización, la descripción describe un método para mantener o el cultivo de células madre cancerosas, que comprende la proporción de células madre cancerosas con un ligando Lgr5 y/o 6 o una pequeña molécula de unión de Lgr5 o 6.

[0162] La invención proporciona además un conjunto de células madre (aisladas) cancerosas de la invención comprende además un compuesto de unión Lgr5 y/o Lgr6 asociado con Lgr5 y/o Lgr6 expresado por dichas células madre cancerosas. La invención proporciona además un cultivo de células madre (aisladas) cancerosas que comprenden un compuesto de unión Lgr5 y/o Lgr6. Preferiblemente, dicho compuesto de unión Lgr5 y/o Lgr6 es un anticuerpo de unión Lgr5 y/o Lgr6 específico o un fragmento o derivado del mismo.

[0163] En una realización preferida, la descripción describe una célula madre de tumor recombinante, aislado de acuerdo con un método de la invención, que comprende un gen indicador bajo el control de un promotor Lgr5 o Lgr6 tal que el producto del gen informador se expresa en células que expresan Lgr5 o Lgr6. Una construcción de gen informador, en el que el gen indicador está unido operativamente a un promotor Lgr5 o Lgr6, se puede insertar en el genoma de un aislado de células madre de tumor. Alternativamente, dicha construcción de gen indicador se puede proporcionar, por ejemplo, a través de la infección de una célula madre de tumor con un vector adenoviral que comprende la construcción del gen reportero. Métodos para la inserción de una construcción de gen informador en el genoma de una célula son conocidos para una persona experta, e incluyen la inserción aleatoria, por ejemplo mediante inserción de un retrovirus que comprende el constructo de gen indicador, o a través de recombinación homóloga.

[0164] En una realización preferida adicional, la descripción describe una célula madre recombinante que comprende un primer gen reportero bajo control de un promotor Lgr5 o Lgr6 tal que el producto del gen informador se expresa en células que expresan Lgr5 o Lgr6, una secuencia que codifica una proteína regulable estando en una unión operativa con el primer gen informador tal que la proteína regulable es co-expresada con el primer producto del gen informador en células que expresan Lgr5 o Lgr6, y un segundo gen indicador que se expresa tras la activación de la proteína regulable.

[0165] Dicho primer producto génico reportero preferiblemente es una proteína fluorescente tal como la proteína verde fluorescente, o la proteína verde fluorescente más preferida. Dicha proteína regulable preferiblemente es CRE-ERT2. El segundo gen informador comprende preferiblemente LacZ.

[0166] Células madre cancerosas aisladas (y, opcionalmente, cultivadas) son, por ejemplo útiles para el análisis adicional de tales células en, por ejemplo, biología molecular bioquímica o nivel marcador,.

[0167] Por otra parte, las células madre aisladas cancerosas también son muy útiles en la identificación de compuestos que se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer, especialmente la terapia de células madre cancerosas. En base al conocimiento de que Lgr5 y/o 6 se insertan en la membrana celular de las células madre cancerosas, los compuestos capaces de inhibir, bloquear o unir Lgr5 y/o 6 pueden diseñarse y prepararse. Tales

compuestos posteriormente pueden ser puestos a prueba por su capacidad de matar o bloquean funcionalmente o inhiben células madre cancerosas que comprenden Lgr5 y/o 6 en sus membranas celulares.

[0168] Las células madre tumorales recombinantes son particularmente preferidas para la identificación de compuestos, ya que su presencia puede ser fácilmente monitorizada después de la adición de un compuesto. Dichas células madre tumorales recombinantes son adecuadas para su uso en ensayos de un alto rendimiento, donde múltiples compuestos se ponen a prueba de una manera rentable.

[0169] En otra realización, la divulgación de este modo describe un método para poner a prueba el efecto de un posible compuesto de células madre anti cáncer comprende poner en contacto (tratar) un conjunto de células madre cancerosas de acuerdo con la invención *in vitro* con dicho posible compuesto de células madre anti cáncer y comprobar si dichas células madre cancerosas tratadas son capaces de generar un tumor en continuo crecimiento y en el que dicho posible compuesto de células madre cancerosas preferiblemente está diseñado como un inhibidor Lgr5 o 6 o como un compuesto de unión Lgr5 o 6.

[0170] En aún otra realización, la invención proporciona un método para comprobar el efecto de un posible compuesto anti cáncer de células madre comprende poner en contacto una colección de células madre cancerosas de acuerdo con la invención *in vitro* con dicho posible compuesto de células madre anti cáncer y comprobando si dichas células madre cancerosas tratadas son capaces de generar un tumor de crecimiento continuo, que comprende además la puesta en contacto de dicho posible compuesto de células madre anti cáncer con un tejido de células madre de órganos y seleccionar un compuesto que afecta específicamente a las células madre tumorales.

[0171] Las células madre cancerosas utilizadas en este método comprenden Lgr5 y opcionalmente Lgr6 en su membrana celular o se pueden obtener por un método de la invención.

[0172] Los compuestos a ensayarse puede por ejemplo obtenerse a partir de una biblioteca de compuestos (pequeña) o pueden específicamente diseñarse en base al conocimiento (estructural) de Lgr5 o 6 o en el conocimiento (estructural) de un ligando (natural) de Lgr5 o 6.

[0173] Los compuestos de células madre anti cáncer serán discutidos en más detalle a continuación.

[0174] En una realización adicional, la descripción describe un inhibidor Lgr5 o 6 o un compuesto de unión Lgr5 o 6. Preferiblemente dicho inhibidor o compuesto de unión es obtenible por un método para comprobar el efecto de un posible compuesto de células madre anti cáncer comprende poner en contacto (tratar) un conjunto de células madre cancerosas de acuerdo con la invención *in vitro* con dicho posible compuesto de células madre anti cáncer y comprobando si dichas células madre cancerosas tratadas son capaces de generar un tumor en continuo crecimiento y en el que dicho posible compuesto de células madre cancerosas es preferiblemente, pero no necesariamente, diseñado como un inhibidor Lgr5 o 6 o como un compuesto de unión Lgr5 o 6.

[0175] Un primer ejemplo de un inhibidor Lgr5 o 6 es un inhibidor de la proteína Lgr5 o 6. Preferiblemente, dicho inhibidor de la proteína Lgr5 o 6 es un derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo o anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 o 6 y más preferiblemente capaz de unirse a la parte de Lgr5 o 6 que se expone en el exterior de la célula madre cancerosa. En aún otra realización preferida, dicho anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a dicha proteína o Lgr5 y 6 y funcionalmente bloquea dicha proteína Lgr5 o 6 mediante la prevención de la unión de un ligando natural de Lgr5 o 6. En una realización, dicho anticuerpo o anticuerpo derivado o fragmento de anticuerpo comprende al menos una secuencia CDR como se muestra en la Figura 27. Preferiblemente, dicho anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de CDR1 y CDR2 de una secuencia y una secuencia de CDR3 de una cadena ligera y/o una cadena pesada representada en la Figura 27. En una realización adicional, dicho anticuerpo es un anticuerpo como se muestra en la Tabla 4 o 5.

[0176] Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos adecuados son scFv y Fab. Ejemplos de derivados adecuados son anticuerpos quiméricos, nanocuerpos, anticuerpos bifuncionales, o anticuerpos humanizados.

[0177] En otra realización más preferida, el anticuerpo utilizado es un anticuerpo monoclonal.

[0178] Otro ejemplo de un inhibidor de proteína Lgr5 o 6 es una molécula pequeña que interfiere con la actividad biológica de Lgr5 o 6. Tal molécula pequeña puede ser un compuesto químico, así como una pequeña proteína y es típicamente diseñado sobre la base del análisis de estructura-función de Lgr5 o 6. El análisis puede comprender el análisis de estructura cristalina de Lgr5 o 6. Las bibliotecas de moléculas pequeñas se pueden cribar o compuestos se pueden diseñar y posteriormente examinarse. Un inhibidor de molécula pequeña también puede ser diseñado en base a la estructura de un ligando (natural) de Lgr5 o 6.

[0179] Sin embargo, otro ejemplo de un Inhibidor Lgr5 o 6 es un inhibidor de la transcripción de ARNm de Lgr5 o 6. Un ejemplo de un inhibidor de transcrito de Lgr5 o 6 son moléculas antisentido. Fármacos antisentido son hebras complementarias de segmentos pequeños de ARNm. Tal molécula antisentido se une al ARNm de Lgr5 o 6 e inhibe

(al menos en parte) la producción de proteínas Lgr5 o 6. Otro ejemplo de un inhibidor de transcrito Lgr5 o 6 se refiere a moléculas de ARN de interferencia (ARNi), tales como moléculas de ARNsi.

[0180] Además de la opción de que un anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a Lgr5 o 6 y funcionalmente bloquea Lgr5 o 6 (como se describe arriba), dicho anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo también se puede unir a Lgr5 o 6 sin bloquear funcionalmente la actividad Lgr5 o 6. Dicho anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo está acoplado preferiblemente a otro compuesto (es decir, otro resto) que es capaz de inhibir funcionalmente una célula madre cancerosa. Un ejemplo de otro compuesto es una toxina. Por lo tanto, la descripción también describe un inhibidor de células madre cancerosas, en el que dicho inhibidor comprende una primera parte que es capaz de unirse a Lgr5 o 6 y una segunda parte que proporciona disfunción de células madre cancerosas. Preferiblemente, dicha primera parte es un anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a Lgr5 o 6 (preferiblemente sin influir en la función de Lgr5 o 6) y dicha segunda parte es una toxina. En esta realización Lgr5 o 6 se utiliza como un objetivo para entregar un compuesto citotóxico a una célula madre cancerosa.

[0181] Por lo tanto, la divulgación describe un compuesto de unión que está vinculado a un agente tóxico o ligado a una enzima capaz de convertir un profármaco en un agente tóxico. Por ejemplo, el anticuerpo o derivado o fragmento del mismo está unido a un agente tóxico para formar un inmunocóndugado. Dicho agente tóxico incluye un radioisótopo y un fármaco tóxico que es ineficaz cuando se administra sistémicamente solo. Mediante la combinación de la especificidad de la orientación de un compuesto de unión a Lgr5 y/o 6 expresando células madre de tumor con el poder de matar de una molécula de efector tóxico, inmunocóndugados permiten una discriminación sensible entre el objetivo y el tejido normal, dando como resultado menos efectos secundarios tóxicos que la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos convencionales. Ejemplos de profármacos que se pueden dirigir a células madre tumorales de expresión Lgr5 o 6 que comprenden mostaza de ácido benzoico por la que el anticuerpo está conjugado con carboxipeptidasa G2; nitrógeno cefalosporina de mostaza-p-fenilenediamina por lo que el anticuerpo está conjugado con beta-lactamasa; y cianofenilmetilbeta-D-gluco-ácido piranosidurónico, por lo que el anticuerpo está conjugado con beta-glucosidasa.

[0182] La descripción describe además un uso de un compuesto de unión como un medicamento para el tratamiento de cáncer. En una realización preferida, dicho compuesto de unión comprende un anticuerpo específico para Lgr5 y/o Lgr6 o un fragmento de unión Lgr5 o 6 o derivado del mismo. En una realización preferida, dicho anticuerpo es un ser humano, humanizado o anticuerpo anti desinmunizado Lgr5 y/o Lgr6 como se describe en el presente documento. En una realización preferida, dicho compuesto de unión es específico para Lgr5 humano y/o Lgr6 humano. Preferiblemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, dicho compuesto de unión es un anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una secuencia de CDR como se muestra en la Figura 27. Preferiblemente, dicho anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de CDR1 y una secuencia de CDR2 y CDR3 una secuencia de una cadena ligera y/o una cadena pesada representada en la Figura 27. En una forma de realización adicional, dicho compuesto de unión es un anticuerpo tal como se representa en la Tabla 4 o 5. En una realización preferida, un compuesto de unión está vinculado a un agente tóxico o ligado a una enzima capaz de convertir un profármaco en un agente tóxico.

[0183] En otra realización, la descripción describe un inhibidor de células madre cancerosas que comprende un ligando Lgr5 o 6 preferiblemente acoplado a otro compuesto (es decir, otro resto) que es capaz de inhibir funcionalmente una célula madre cancerosa. Un ejemplo de otro compuesto es una toxina. Ejemplos de un ligando Lgr5 o 6 son ligandos que son un miembro de la familia de péptidos de insulina. Ejemplos adecuados son InsI5 y Relaxina3. Otro ejemplo adecuado es una proteína-cisteína-nudo tales como Noggin, Gremlina, Dan, o Cerberus. Por otra parte, un ligando natural puede ser modificado de tal manera que bloquea permanentemente actividad Lgr5 o 6.

[0184] Todo los inhibidores de proteína Lgr5 o 6 anteriores, los inhibidores de la transcripción de ARNm de Lgr5 o 6, así como los inhibidores de células madre cancerosas descritas son muy útiles para métodos de terapia de cáncer terapéuticos.

[0185] En otra realización, la descripción describe el uso de al menos un Inhibidor Lgr5 o 6 o al menos un compuesto de unión Lgr5 o 6 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un Inhibidor Lgr5 o 6 de la proteína o un inhibidor de las transcripciones de ARNm de Lgr5 o 6 o un inhibidor de células madre cancerosas) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

[0186] Preferentemente, dichos inhibidores son obtenibles de acuerdo con un método de la invención, es decir, un método para comprobar el efecto de un posible compuesto de células madre anti cáncer comprende la puesta en contacto (tratamiento) de un conjunto de células madre cancerosas de acuerdo con la invención *in vitro* con dicho posible compuesto anti cáncer de células madre y comprobando si dichas células madre cancerosas tratadas son capaces de generar un tumor en continuo crecimiento y en el que dicho posible compuesto de células madre cancerosas está diseñado preferiblemente como un Inhibidor Lgr5 o 6 o como un compuesto de unión Lgr5 o 6. En una realización preferida, se hace uso de un Inhibidor Lgr5 o 6 o un compuesto de unión Lgr5 o 6.

[0187] La descripción describe además un método para reducir o inhibir el potencial de mantenimiento de tumor de un tumor, que comprende la proporción de dicho tumor con un compuesto que está diseñado como un inhibidor Lgr5 y/o 6, o, preferiblemente, que es capaz de unirse a Lgr5 y/o 6.

[0188] Una terapia de células madre anti cáncer es muy útil para erradicar la parte del tumor que mantiene el tumor y está implicada en el crecimiento invasivo y la metástasis. Aunque un enfoque de este tipo se considera una terapia de cáncer muy eficaz, la mejora o aumento de los resultados se pueden obtener mediante la combinación de la terapia de células madre anti cáncer con la terapia convencional cancerosa.

[0189] En una realización preferida, la descripción describe el uso de al menos un Inhibidor Lgr5 o 6 o al menos un compuesto de unión Lgr5 o 6 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un Inhibidor Lgr5 o 6 de la proteína o un inhibidor de las transcripciones de ARNm de Lgr5 o 6 o un inhibidor de células madre cancerosas) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, que comprende además la terapia en general anti-cáncer. Los ejemplos de dicha terapia anti cáncer general (o convencional), son la radiación, la quimioterapia, la terapia basada en anticuerpos o tratamientos a base de moléculas pequeñas. El tratamiento combinado da lugar a un enfoque de matar la población de células madre cancerosas minoritarias, así como la mayor parte del tumor.

[0190] En otra realización preferida, la descripción describe el uso de al menos un Inhibidor Lgr5 o 6 o al menos un compuesto de unión Lgr5 o 6 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un Inhibidor Lgr5 o 6 de la proteína o un inhibidor de las transcripciones de ARNm de Lgr5 o 6 o un inhibidor de células madre cancerosas) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que las células madre cancerosas están involucradas en el cáncer intestinal, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de piel, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de próstata, meduloblastoma cerebral u otros tipos de cáncer, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de folículo piloso, cáncer de retina, feocromcitoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer testicular, cáncer de ovario, carcinoma de células de basilea de la piel o cáncer de pulmón. A este respecto, "involucrado" significa sostener y/o mantener y/o expandir.

[0191] Preferiblemente, el tratamiento con al menos un inhibidor Lgr5 y/o 6 o al menos un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 se inicia antes, después o durante dicha terapia de cáncer convencional.

[0192] Aunque el tratamiento con al menos un inhibidor Lgr5 y/o 6 o al menos un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 se considera eficaz, el tratamiento con múltiples inhibidores y/o compuestos de unión puede proporcionar mejores resultados. Esto es especialmente cierto si el cáncer de células madre a tratarse comprende dos, tres o incluso más proteínas diferentes LGR incrustadas en su membrana celular.

[0193] En una realización preferida, la descripción describe el uso de al menos un inhibidor Lgr5 y/o 6 o al menos un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un Inhibidor Lgr5 o 6 de la proteína o un inhibidor de la transcripción de ARNm de Lgr5 o 6 o un inhibidor de células madre cancerosas) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que al menos dos Inhibidores Lgr5 y/o 6 o al menos dos compuestos de unión Lgr5 y/o 6 o una combinación de al menos un inhibidor Lgr5 y/o 6 de Lgr5 y al menos un compuesto de unión Lgr5 y/o 6.

[0194] La divulgación de este modo describe el uso de al menos dos inhibidores Lgr5 y/o 6 o al menos dos compuestos de unión Lgr5 y/o 6 o una combinación de al menos un inhibidor Lgr5 y/o 6 y al menos un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células madre cancerosas. Un inhibidor y/o compuesto de unión puede, pero no necesariamente se dirige a una y la misma proteína Lgr, por ejemplo, un compuesto de unión y un inhibidor contra Lgr5. La mezcla de al menos dos inhibidores Lgr5 o 6 o al menos dos compuestos de unión Lgr5 o 6 o una combinación de al menos un inhibidor Lgr5 o 6 y al menos un Compuesto de unión Lgr5 o 6 es, por ejemplo dirigido contra Lgr5 y 6. Este último es especialmente útil en un método para la obtención de células madre cancerosas de cerebro, cabeza y cuello, testículo, mama, próstata, piel, de ovario o folículo piloso.

[0195] Otro compuesto útil que ya se ha descrito es un inhibidor de células madre que comprende un ligando Lgr5 y/o 6 preferiblemente acoplado a otro compuesto (es decir, otro resto) que es capaz de inhibir funcionalmente una célula madre cancerosa. Un ejemplo de otro compuesto es una toxina. Ejemplos de un ligando Lgr5 o 6 son ligandos que son un miembro de la familia de péptidos de insulina. Ejemplos adecuados son InsI5 y Relaxina3. Otro ejemplo adecuado es una proteína-cisteína-nudo tales como Noggin, Gremlina, Dan, o Cerberus. Tal compuesto también puede ser utilizado en una terapia de células madre cancerosas.

[0196] Por lo tanto, la divulgación describe el uso de un compuesto que es capaz de unirse a un ligando de Lgr5 y/o 6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células madre cancerosas. Preferiblemente, dicho ligando está acoplado a otro compuesto (es decir, otro resto) que es capaz de inhibir funcionalmente una célula madre cancerosa, tal como una toxina o una enzima capaz de convertir un profármaco en un agente tóxico. Incluso más preferiblemente, tal tratamiento se combina con la terapia cancerosa, tal como la radiación, la quimioterapia, la terapia basada en anticuerpos o tratamientos a base de moléculas pequeñas.

[0197] En otra realización, la descripción describe el uso de un compuesto que es capaz de unirse a un ligando de Lgr5 y/o 6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células madre cancerosas. Preferiblemente, la unión de dicho compuesto a un ligando Lgr5 y/o 6 es tal que dicho ligando ya no es capaz de unirse a Lgr5 y/o 6. Un ejemplo es un anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que captura un ligando (natural) de Lgr5 y/o 6 y por lo tanto impide la activación de Lgr5 y/o 6.

[0198] La descripción describe además una composición que comprende al menos un inhibidor Lgr5 y/o 6 o al menos un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 o por lo menos un ligando Lgr5 y/o 6 o al menos un compuesto capaz de unirse a un ligando Lgr5 y/o 6, preferiblemente como se describe anteriormente. Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica puede comprender, además, cualquier excipiente, estabilizador, activador, portador, permeabilizador, propulsor, desinfectante, diluyente y/o conservante farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica puede estar en cualquier forma deseada, por ejemplo un comprimido, fluido de infusión, cápsula, jarabe, etc.

[0199] En una realización preferida adicional, una composición (farmacéutica) comprende al menos dos inhibidores Lgr5 y/o 6 o al menos dos compuestos de unión Lgr5 y/o 6 o una combinación de al menos un inhibidor Lgr5 y/o 6 y al menos un compuesto de unión Lgr5 y/o 6.

[0200] Ahora que los inventores han divulgado que Lgr5 y/o 6 son marcadores de células madre cancerosas esto abre más a fondo las posibilidades en el campo del diagnóstico. Se puede por ejemplo utilizar un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 de unión para determinar el contenido de células madre cancerosas de un tumor o para determinar la presencia o ausencia de células madre cancerosas en un fluido corporal tal como sangre. Preferiblemente, el compuesto de unión tiene una elevada afinidad por Lgr5 o 6 (es decir, la K_d es de al menos 10^{-7}). Compuestos de unión adecuados son un ligando Lgr5 y/o 6, un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y/o 6, por ejemplo, un anticuerpo o derivado o fragmento que tiene afinidad por Lgr5 y/o 6.

[0201] La divulgación de este modo también describe un método para determinar el contenido de células madre cancerosas de un tumor, que comprende la puesta en contacto de dicho tumor con un compuesto de unión Lgr5 y/o 6, eliminando el compuesto no unido de unión y determinando si cualquier compuesto de unión unido está presente en dicho tumor.

[0202] En una realización preferida, dicho método es un método *in vitro*. Incluso más preferiblemente, dicho compuesto de unión está marcado de manera que puede identificarse. Los marcadores adecuados son, por ejemplo una proteína (fragmento) tal como la cola de anticuerpo Fc o proteína estafilocócica A o glutatión-S-transferasa, una etiqueta de péptido antigénico corto tal como etiqueta de Myc, FLAG o HA o una etiqueta histidina oligomérica, una etiqueta enzimática tal como fosfatasa alcalina, una etiqueta de proteína fluorescente (por ejemplo, proteína verde fluorescente). Sin embargo, también es posible utilizar un segundo compuesto que tiene afinidad por el compuesto de unión y el etiquetado de dicho segundo compuesto con un marcador adecuado (es decir, un análisis indirecto).

[0203] Para la aplicación *in vivo*, la descripción describe además el uso de un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 en la preparación de un diagnóstico para el diagnóstico de la presencia de células madre cancerosas y/o contenido en un tumor.

[0204] Dicha muestra es por ejemplo obtenida a partir de un fluido corporal o una muestra obtenida de un tumor sólido.

[0205] En una realización preferida, la descripción describe un método para determinar el contenido de células madre cancerosas de un tumor, que comprende la puesta en contacto de dicho tumor con un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 y determinar si cualquier compuesto de unión unido está presente en dicho tumor. La descripción también describe el uso de un compuesto de unión Lgr5 y/o 6 en la preparación de un diagnóstico para el diagnóstico de cáncer de presencia de células madre y/o el contenido en una muestra, en el que dicho compuesto de unión está conjugado a una sustancia que permite obtener imágenes radiactivas, tomografía de emisión de positrones (TEP), la resonancia magnética (RM), o tomografía computarizada / de rayos X (TC).

[0206] La descripción describe además un método para determinar si un fluido corporal comprende una célula madre cancerosa, que comprende

- obtener opcionalmente una muestra de dicho fluido corporal
- poner en contacto dicho fluido corporal con un compuesto de unión Lgr5 y/o 6
- eliminar el compuesto de unión no unido
- detectar cualquier complejo unido que comprende un compuesto de unión Lgr5 y/o 6, y la determinación de la presencia de un cáncer de células madre basado en la presencia de complejo unido detectado.

[0207] Compuestos de unión adecuados son un ligando de Lgr5 y/o 6, un anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y/o 6, es decir, un anticuerpo o derivado o fragmento del mismo que tiene afinidad por Lgr5 y/o 6.

[0208] El paso de retirar cualquier compuesto de unión no unido se consigue por ejemplo por lavado con una solución o tampón adecuado.

[0209] Los ejemplos de fluidos corporales son sangre, orina, líquido linfático o lágrimas.

[0210] En una realización preferida, dicho método es un método *in vitro*.

[0211] Los marcadores adecuados se han mencionado anteriormente.

[0212] Los métodos de diagnóstico descritos son también muy útiles para determinar si una terapia anti cáncer lleva a la erradicación de (al menos una parte) de las células madre cancerosas. Si por ejemplo se hace uso de la terapia general contra el cáncer (o combinar el tratamiento con por ejemplo un inhibidor Lgr5 y/o 6), el efecto de dicha terapia en el cáncer de células madre se puede determinar mediante la determinación de la presencia o ausencia de células que llevan Lgr5 y/o 6.

[0213] En otra realización más, la invención proporciona un método para determinar la efectividad de un tratamiento anti cáncer, que comprende la puesta en contacto de dicho cáncer con una Lgr5 y opcionalmente un compuesto de unión Lgr6, en el que dicho compuesto de unión Lgr5 es un fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo o anticuerpo capaz de unirse a Lgr5.

[0214] Dicho método se realiza *in vitro*.

[0215] La presencia de células madre cancerosas se determina antes del tratamiento y después del tratamiento, y, opcionalmente, durante el tratamiento, de manera que pueda determinarse si el tratamiento aplicado resulta o no en una cantidad cambiada (preferiblemente disminuida) de la cantidad de células madre cancerosas.

[0216] La descripción describe además un método para tratar a un individuo en necesidad del mismo que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento a dicho individuo y, opcionalmente, someter además dicho individuo a la terapia de cáncer convencional tal como radiación o quimioterapia.

[0217] La invención se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos.

Leyendas de figuras

[0218]

Figura 1. Gpr49/Lgr5 es un gen diana de Wnt en una línea celular de cáncer de colon humano y se expresa en criptas del ratón. a: análisis de transferencia Northern (panel superior); gel teñido con bromuro de etidio (panel inferior). Carril 1: Control de las células Ls174T-L8. Carril 2: Células LS174T después de la inhibición inducida de vía Wnt de doxiciclina de 24 horas como en 6 (Referencias 2). Se ha de tener en cuenta la fuerte regulación a la baja de la 4,4 kb Grp49 ARNm de de la inhibición por vía Wnt. Carril 3: ARN extraída de criptas intestinales aisladas de ratón pequeñas, que sufre inevitablemente de la degradación limitada que resulta en manchas. Carril 4: ARN extraída de vellosidades aisladas de ratón. Nótese la expresión específica de Grp49 en las criptas del ratón. b/c Dos imágenes superpuestas de una hibridación in situ realizada en el intestino delgado de un ratón APCmin, ilustrando la expresión ubicua de Grp49 en partes inferiores de las criptas (ejemplos marcados con flechas blancas) y la expresión en el adenoma en el panel izquierdo (marcado por una línea discontinua).

Figura 2. Expresión Gpr49/Lgr5 en el ciclo de las células columnares de base de cripta (CBC) del intestino delgado. a-c, hibridación In-Situ se realizó con sondas específicas para genes diana 3 Tcf que demuestran patrones de expresión que no se solapan en el epitelio de las criptas. a: Criptidina marca específicamente las células de Paneth en la base cripta; b: las marcas de KIAA0007 de las células Ta situadas por encima de las células de Paneth c: Gpr49/Lgr5 se expresa específicamente en las células 4-8 entremezcladas con las células de Paneth en la base cripta. Todos los controles fueron negativos sensoriales (no mostrados). d: células CBC (círculos) son sólo escasamente visibles en las secciones teñidas de heamatoxilina/eosina. e: células CBC (círculo) son KI67 + f: Algunas células expresan el marcador de CBC-M fase fosfo-histidina H3 (en el círculo). g: la incorporación de BrdU en las células CBC4 horas después de una dosis única de BrdU (en el círculo). h: incorporación de BrdU en las células CBC después del marcaje BrdU continuo de 24 horas (en el círculo). Las barras negras: número de células BrdU-positivas CBC por sección de cripta después de 4 horas o 24 horas. Barra blanca: Número total de células CBC por sección de cripta evaluada contando las células lacZ-positivas en ratones Gpr49-LacZ.

Figura 3. La expresión restringida de un gen reportero de Gpr49-LacZ en ratones adultos a: Generación de ratones que llevan lacZ integrada en el último exón del gen Gpr49, la eliminación de todas las regiones transmembranas de la proteína Gpr49 codificada. bh, Expresión de Gpr49lacZ en tejidos de ratón adulto seleccionados. b/c: En el intestino delgado la expresión está restringida a las células delgadas 6-8

entremezcladas con las células de Paneth en la base cripta. d/e: En el colon, la expresión se limita a unas pocas células localizadas en la base cripta. f/g: Expresión en el estómago se limita a la base de las glándulas. h: En las glándulas mamarias, la expresión fue evidente sólo en glándulas más pequeñas, de proliferación activa, donde se restringe las células epiteliales basales. i: En la piel, la expresión se produce en la vaina radicular externa de los folículos pilosos en un dominio que se extiende desde el bulto a la papila dérmica.

Figura 4. Expresión de EGFP en un ratón knock-in Gpr49-EGFP-IRES-CreERT2 reproduce fielmente el patrón de expresión Gpr49lacZ en el tracto intestinal. a: Generación de ratones que expresan EGFP y CreERT2 de un solo mensaje bicistrónico por genes knock-in en el primer exón de Gpr49. b, c, e: Imaginología confocal GFP de contraste con el colorante de ADN rojo ToPro-3 confirma que la expresión de Gpr49 está restringida a las células 6-8 delgadas intercaladas entre las células de Paneth en la base de la cripta del intestino delgado. b: Unidad de cripta-vellosidad completa; c: ampliación de las regiones de las criptas; d: El análisis inmunohistoquímico de la expresión de EGFP en las criptas intestinales. e: imagen2D de la reconstrucción 3D suministrado como película suplementaria en la Fig. 7. f: formación de imágenes confocales de expresión EGFP en el colon confirma la expresión de Gpr49 está restringido a unas pocas células localizadas en la base cripta. g: la sección de cryoEM cripta manchada para GFP con inmunoelectrónica (barra de escala=1000 nm). La cuantificación de la especificidad de su etiquetado: Las partículas de oro se contaron más de 255 μm^2 de citosol de la célula CBC (1113 partículas), 261 μm^2 de citosol de células de Paneth (305 partículas) y 257 μm^2 de citosol de fibroblastos (263 partículas) fuera de la cripta. De este modo citoplasma CBC tenía 4,36 partículas de oro/ μm^2 en comparación con las células de Paneth 1,17 partículas de oro/ μm^2 y para el control de fibroblastos 1,02 partículas de oro/ μm^2 . C= lumen de cripta; P=células de Paneth; CBC= Células columnares de base cripta. h: sección CryoEM sin etiqueta (barra de escala=2.000 nm), lo que subraya las características ultraestructurales de las células CBC y su posicionamiento en relación con las células de Paneth.

Figura 5. El seguimiento de linaje en el intestino delgado y el colon. a: El ratón knock-in Gpr49-EGFP-IRES-CreERT2 cruzado con los ratones reportero Rosa26-LacZ 12 horas después de la inyección de tamoxifeno b: frecuencia con la que las células azules aparecieron en posiciones específicas relativas a la parte inferior de cripta, de acuerdo con el esquema en el recuadro de la Figura 5b. La gran mayoría de las células marcadas Cre+ CBC-LacZ se produjo en posiciones entre las células de Paneth, mientras que sólo el 10% de estas células se observaron en la posición 4 directamente por encima de las células (línea azul). Los datos cuantitativos sobre la posición de las células de la etiqueta de retención de ADN obtenidas a largo plazo en ratones después de la irradiación de adultos (que marcan las células madre intestinales "4") han sido publicadas recientemente por Potten y cols.17. La comparación de estos datos (línea roja) con la posición de las células CBC que portan Cre activa. c-e: El análisis histológico de la actividad de LacZ en el intestino delgado 1 día después de la inducción (c), 5 días posteriores a la inducción (d) y 60 días después de la inducción (e). f-h: doble etiquetado de intestino teñido con LacZ usando PAS demuestra la presencia de células caliciformes (f; flechas blancas) y células de Paneth (g; flechas azules) en los clones azules inducidos. Etiquetado doble con sinaptofisina demuestra la presencia de células enteroendocrinas dentro de los clones inducidos azules (h; flechas negras). i-k Análisis histológico de la actividad LacZ en el colon 1 día después de la inducción (i), 5 días después de la inducción (j) y 60 días después de la inducción (k).

Figura 6. Estrategia para EGFP-IRES-CreERT2 casete knock-in en el locus de Gpr49

- a: Estructura esquemática del gen de ratón Gpr49
- b: estrategia de transferencia de Southern para detectar células ES transfectadas con una construcción knock-in en la orientación del inicio de transformación ATG en el exón I.
- c: Cuatro clones de células ES de un total de 500 se calificó como positivo para la banda BamHI recombinada funcionando a 4,3 kb. Después de la reinspección de estos clones 4 ES, se seleccionaron los dos primeros (asteriscos) para inyección de blastocisto.

Figura 7. sensibilidad a la radiación relativa de células CBC, +4 células, y células TA. Los ratones adultos fueron irradiados con 1 Gy o 10 Gy y posteriormente se sacrificaron 6 horas más tarde, en el pico de la apoptosis. A: células caspasa-3-positivas activas se visualizaron mediante técnicas de inmunohistoquímica (panel superior - flechas negras que destacan las células positivas +4 tras la irradiación 1Gy; flechas blancas de panel bajo que destacan las células positivas después de la irradiación CBC 10Gy). b: La frecuencia de células positivas por cripta se determinó contando tres clases: las células CBC (situadas entre las células de Paneth), +4 células (situadas directamente en de las células de Paneth) y células TA: localizadas en la posición 5-15. Apoptosis máxima a +4 ya se alcanza a 1 Gy mientras que 10 Gy provoca significativamente más apoptosis que irradiación 1 Gy en las células CBC.

Figura 8. Análisis de montaje completo de la expresión de LacZ en el intestino delgado del ratón knock-in Gpr49-EGFP-IRES-CreERT2 cruzado con ratones reporteros Rosa26-LacZ en los puntos de tiempo indicados después de la inyección de tamoxifeno a:1 día post-inducción. b: 5 días post-inducción. c: 60 días después de la inducción.

Figura 9. Colocalización del marcador de proliferación Ki67 y las células CBC GFP-positivas en las criptas

intestinales de los ratones Gpr49-EGFP-CreERT2 (secciones de serie).

Figura 10. Secuencias de los receptores humanos, de ratones y de ratas.

Figura 11. Predicción de estructura de LGR4, 5 y 6.

Figura 12. Expresión restringida de un gen reportero de Gpr49-LacZ en expresión de ratones adultos de Gpr49lacZ en tejidos de ratón adulto seleccionados. Lgr5 se limita a poblaciones de células raras en el cerebro (glomérulos del bulbo olfatorio y varias otras regiones mal definidas) (A), el ojo (capa interna nuclear de la retina) (B), el hígado (células que rodean a las tríadas portales) (C) y la glándula adrenal (D)

Figura 13. Seguimiento de linaje en el estómago ratones Lgr5-EGFP-CreERT2 se cruzaron con ratones reporteros Rosa26R y actividad de la enzima Cre inducida células LGR5+ve por inyección IP de tamoxifeno. La actividad del gen reportero LacZ se limita inicialmente a las células Lgr5 (A), pero rápidamente se expande para incluir todo el epitelio en el estómago con el tiempo (B). Este "seguimiento de linaje" se mantiene durante largos períodos de tiempo (B). Esto demuestra que todas las células epiteliales se derivan de la población Lgr5+ve en este tejido, lo que demuestra que son células madre.

Figura 14. Seguimiento de linaje en la glándula mamaria de ratones Lgr5-EGFP-CreERT2 se cruzó con ratones reporteros Rosa26R y actividad de la enzima Cre inducida en las células Lgr5+ve por inyección IP de tamoxifeno. La actividad del gen reportero LacZ se limita inicialmente a las células Lgr5 (A), pero se expande para incluir el mioepitelio de glándulas de la leche recién formado en las mujeres en período de lactancia (B), lo que indica que Lgr5 está marcando específicamente células madre mioepiteliales en este órgano.

Figura 15. Seguimiento de linaje en la glándula suprarrenal. Los ratones Lgr5-EGFP-CreERT2 se cruzaron con ratones reporteros Rosa26R y actividad de la enzima Cre inducida en células Lgr5+ve por inyección IP de tamoxifeno. La actividad del gen reportero LacZ se limita inicialmente a las células Lgr5 (A), pero se expande para incluir la médula de la glándula adrenal (B), lo que indica que Lgr5 está marcando específicamente células madre de médula suprarrenal.

Figura 16. Lgr6 se expresa en células de la zona de protuberancia superior del folículo del pelo del ratón y en las células basales de la epidermis. Secciones de piel de ratones Lgr6-EGFP-IRES-CreERT2 de aprox. 26 días de edad (anágena temprana) y se tiñeron para el ADN nuclear (Topro) y EGFP se visualizaron utilizando microscopía confocal (CA). Durante anagen temprano Lgr6 se expresa en la protuberancia superior (A, C) y la epidermis basal (A, B).

Figura 17. La progenie de células Lgr6+ contribuye a todas las estructuras de los folículos pilosos (HF), la epidermis interfolicular (IFE) y las glándulas sebáceas (SG). Para el seguimiento de la progenie de células Lgr6+ de ratones Lgr6-EGFP-IRES-CreERT2/ROSA26-LacZ fueron inyectados con tamoxifeno (TM) en P20 cuando FCs están en telogen (A). En P23 se detectó una primera tinción en el IFE y los fondos de cobertura (B) se detectaron. Análisis de progenie de tinción LacZ en P38 (1ª fase anágena, C, D) y P52 (2º telógeno, E, F) reveló contribución a todas las partes del HFs, IFEs y SGs.

Figura 18. La progenie de células Lgr6+ contribuye al mioepitelio del pulmón. Para el seguimiento de la progenie de células de ratones Lgr6+ Lgr6-EGFP-IRES-CreERT2/ROSA26-LacZ se inyectó con tamoxifeno (TM) en P20. Análisis de la tinción de progenie LacZ en P38 (magnificación A, 10x, 20x y 40x de izquierda a derecha) y P52 (B, 10x, 20x y 40x de izquierda a derecha) reveló contribución al mioepitelio subyacente a los bronquiolos del pulmón.

Figura 19. Bajas dosis de inducción oral con β -NF no inducen supresión mediada por Cre en las células madre de ratones AhCre. Montajes enteros intestinales tiñeros por β -galactosidasa a partir de ratones AhCre+ Rosa26R+. a: No activación del gen reportero Rosa-lacZ se observa en los intestinos de ratones AhCre+ Rosa26R+ no inducidos. b: Expresión de lacZ fácilmente visible a lo largo del intestino 2 días después de una sola alimentación forzada de 1 mg/kg β -naptoflavona, lo que indica la activación mediada por Cre eficiente del reportero lacZ. Ninguna expresión de lacZ es visible en la base de cripta (panel inferior) que demuestra la ausencia de recombinación mediada por Cre en la base de cripta. c: Ninguna unidad de cripta/vellosidades lacZ-positiva es visibles en todo el montaje en los intestinos 100 días después de la inducción, lo que indica que este régimen de dosificación muy rara vez causa la recombinación dentro de las células madre intestinales.

Figura 20. La transformación de las células no madre a través de la pérdida de APC no conduce de manera eficiente a la formación de adenoma durante períodos de tiempo extendidos. a-c: β -catenina IHC realizado en las secciones intestinales de AhCre+ Rosa26R+ Apcl/fl 3 días después de una sola alimentación forzada de 1,0 mg/kg β -naptoflavona. Los racimos de células transformadas con β -catenina nuclear se observaron frecuentemente en la vellosidad (a) y las regiones superiores de la cripta (b). Grupos β -catenina^{alta}sólo muy raramente se observaron en la base de cripta (c). Estas agrupaciones se resaltan con flechas negras. d: La cuantificación de la ubicación de los grupos de células altas β -catenina en secciones intestinales de AhCre+

Rosa26R+ Apcfl/fl 4 días después de una sola alimentación forzada de 1,0 mg/kg β -naptoflavona. Diagramas de caja que muestran el número de focos observado en la base de cripta, la cripta superior y la vellosidad en 1600 unidades de las criptas-vellosidades. Significativamente más grupos se observaron en las regiones superiores de la cripta que cualquier otra región ($p=0,04$, Mann Whitney, $n=3$). Focos B-catenina nucleares se observaron muy pocas veces en la base cripta. e: β -catenina IHC se realiza en sección intestinal de AhCre+ Rosa26R+ Apcfl/FL 24 días a partir de una única alimentación forzada de 1,0 mg/kg β -naptoflavona. Aquí, β -catenina nuclear se ve en una pequeña lesión 24 días después de la inducción cre. f, g: β -catenina IHC se realiza en la sección intestinal de AhCre+ Rosa26R+ Apcfl/FL 167 días después de una sola alimentación forzada de 1,0 mg/kg β -naptoflavona que muestra un micrófono roadenoma (f) y pequeño adenoma (g) con β -catenina nuclear. h: cuantificación de la formación de adenoma durante periodos de tiempo extendidos en AhCre+ Rosa26R+ Apcfl/fl después de una sola alimentación forzada de 1,0 mg/kg β -naptoflavona. El tamaño de las lesiones se puntuó en montajes enteros intestinales de ratones AhCre+ Rosa26R+ Apcfl/fl que habían sido teñidos para lacZ para ayudar a visualizar las lesiones pequeñas (al menos 3 ratones se utilizaron para cada punto de tiempo). Ningún adenoma se observó en los ratones hasta e incluyendo el día 24 y sólo había Microadenoma muy rara en los ratones en el día 24. Se observó que el adenoma ocasional en AhCre+ Rosa26R+ Apcfl/fl a 100 días (más), sin embargo la mayoría de las lesiones se mantuvo microscópica, mostrando que la mayoría de las lesiones no estaban progresando a adenoma a pesar de un período largo de latencia.

Figura 21. Células madre intestinales Lgr5+ve transformadas después de la pérdida de APC persisten y alimentan la rápida formación de microadenomas β -catenina alta. a-i: Las consecuencias de la transformación de células madre intestinales Lgr5+ve y su destino subsiguiente se rastreó a través de un periodo de ocho días utilizando β -catenina y GFP como marcadores de células transformadas y células madre Lgr5+ve respectivamente. a-c: Acumulación del efector Wnt, β -catenina se observó por primera vez en células madre Lgr5+ve dispersas 3 días después de la inducción de Cre en intestinos Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2/APCfl/fl. Ejemplos representativos de células madre β -catenina^{alta}Lgr5+ve se circulan. d-f: Cinco días después de la inducción células madre Lgr5-GFP+ve transformadas permanecen (e,f: flechas negras) y se asocian con los racimos de células transformadas (β -catenina alta) dentro del compartimiento de TA. g-h: Ocho días después de la inducción los racimos de células transformadas se han expandido para llenar el compartimiento de TA (h: círculo rojo). Las células madre Lgr5-GFP+ve transformadas en la base de cripta persisten (h,i: flechas negras), pero su progenie transformada dentro del compartimiento de TA son Lgr5-GFP-ve. (h,i: círculos rojos).

Figura 22. Las células madre de Lgr5+ve de transformación selectiva después de la pérdida de eficiencia APC impulsa la formación de adenoma en todo el intestino delgado. a-h: La aparición y el desarrollo de los adenomas intestinales y la expresión del marcador de células madre Lgr5-GFP dentro de estos adenomas se siguió en un período de 36 días usando GFP (f) y β -catenina (todos los demás) IHC. a-b: Múltiples pequeños adenomas son fácilmente visibles en todo el intestino 14 días después de la transformación de células madre Lgr5+ve. c-f: Múltiples adenomas macroscópicos (> 100) se presentan después de 24 días. La expresión de Lgr5-GFP en los adenomas se restringe a las células dispersas raras (f; un círculo). g,h: A los 36 días, una gran proporción del intestino está lleno de adenomas macroscópicos.

Figura 23. La presencia de células madre Lgr5+ en adenomas intestinales. Adenomas intestinales expresan altos niveles de β -catenina como resultado de la activación crónica de la vía de Wnt (A). A diferencia de otros genes diana de Wnt que son altamente expresados durante todo el adenoma (no mostrado), la expresión del marcador de células madre intestinal Lgr5-GFP se restringe a células dispersas con morfología característica de células madre: delgadas, células en forma de coma; se indica con la flecha negra (B). Especulamos que estas células Lgr5+ve dentro del adenoma son células madre dedicadas a mantener el crecimiento del adenoma (las llamadas células madre cancerosas).

Figura 24. Análisis FACS de la expresión LGR5 en células L8, que son derivados clonales de las células LS174T, que expresan Tcf4 (DNTcf4) dominante negativo sobre doxiciclina (DOX). DNTcf4 apaga vía Wnt activa constitutiva. Después de 48 horas de inducción DOX, se observa una reducción en los niveles de proteína hLgr5. Rat IgG se utiliza como control de isotipo negativo. 9G5 es un anticuerpo derivado de rata monoclonal dirigido contra hLgr5

Figura 25. Comparación de las células madre Lgr5+ y de su descendencia directa. Células epiteliales GFP positivas desde suspensiones celulares preparadas a partir de las criptas recién aisladas de ratones Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2. El análisis FACS distinguió una población GFP-alta (GFP^{hi}) y GFP-baja (GFP^{lo}), que tentativamente identificamos como células CBC y sus células hija de amplificación de tránsito inmediata, respectivamente (A). Un ejemplo de un gen Wnt-sensible, Sox9, que muestra la expresión de alto nivel en las células de CBC, pero las células TA directamente por encima de las células de Paneth también expresan este gen en hibridaciones *in situ*, aunque a un nivel mucho más bajo (B).

Figura 26. Tinción hLgr5 endógena de una línea celular de cáncer de colon humano (L8) usando varios anticuerpos monoclonales Lgr5-específicos. Células L8 son un derivado clonal de la línea celular LS174T parental. Tras la inducción de doxiciclina (DOX) las células L8 expresan una forma dominante negativa de Tcf-4 (DNTcf4). DNTcf4 bloquea eficazmente la actividad de la vía Wnt constitutiva en estas células y en consecuencia apaga genes diana TVC. Después de 48 horas de inducción de DOX se observa una importante reducción en los

niveles de proteína hLgr5. IgG de rata se utiliza como control de isotipo negativo.

Figura 27. Secuencias de cadena ligera + cadena pesada se analizaron utilizando el método KABAT. Las regiones CDR están en negrita y en cursiva.

Ejemplos

Ejemplo 1

Parte experimental

Transferencia de Northern y la inhibición inducida por vía Wnt en LS174T

[0219]

clon L8: Como en van de Wetering, M. et al. El complejo de beta-catenina/TCF-4 impone un fenotipo progenitor de cripta en células de cáncer colorrectal. *Célula* 111, 241-50 (2002). La sonda se extendió por el marco de lectura de ratón Gpr49. Cripta y preparaciones epiteliales de vellosidades para el aislamiento de ARN se generaron a partir 0,5cm longitudes de intestino por 4 rondas sucesivas de incubación en 30 mM EDTA precalentado a 37°C durante 10 minutos, seguido de agitación vigorosa (10x) en PBS enfriado. Las fracciones 1 y 4, que comprenden predominantemente vellosidades y criptas respectivamente se utilizaron para el aislamiento de ARN.

Ratones: Ratones Gpr49-LacZ se generaron por recombinación homóloga en células ES dirigidas a un casete de Ires-LacZ al extremo 5' del último exón, eliminando esencialmente la región que contiene todas las regiones TM y la creación de un alelo nulo (Lexicon). Ratones Gpr49-EGFP-IRES-CreERT2 se generaron por recombinación homóloga en células ES dirigidas a un casete EGFP-IRES-CreERT2 a la ATG de Gpr49. Ratones reporteros Rosa26 Cre-lacZ se obtuvieron de Jackson Labs.

Inducción de tamoxifeno: Los ratones de al menos 8 semanas de edad se inyectaron una vez por vía intraperitoneal con 200 µl de tamoxifeno en aceite de girasol a 10 mg/ml. **Inyección BrdU:** Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal a intervalos de cuatro horas con 200 µl de una solución de BrdU en PBS a 5 mg/ml.

Microscopía de Inmunoelctron: Los intestinos fueron disecados y fijados a perfusión en 4% PFA en 0,2 M PHEM-tampón, incrustados en la gelatina, crio seccionados con crioultratoma Leica FCS e inmunoetiquetados frente a GFP con anticuerpo anti-GFP de conejo policlonal. Las muestras se cortaron usando un cuchillo de diamante Cryotrim 90 a -100°C (Diatome, Suiza) y se cortaron secciones ultrafinas de 70 nm a -120°C, utilizando un cuchillo Cryoimmuno (Diatome, Suiza). Para las imágenes de EM de baja magnificación las partículas de oro de proteína A de 15 nm se mejoraron brevemente con plata (UMCU, Utrecht, Países Bajos) con R-GENT SE-EM (Aurion, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La unión no específica a gránulos de células de Paneth se disminuyó por la aplicación de la solución de bloqueo (Aurion, Países Bajos) antes del anticuerpo primario.

[0220] Preparación de muestras de tejidos para la inmunohistoquímica, hibridación in-situ y análisis de expresión LacZ: Se realizaron como se describió anteriormente en Muncan, V. et al. Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol* 26, 8418-26 (2006). Sondas *in-situ* que comprenden un fragmento N-terminal de 1kb mGPR49 se generaron a partir del clon de imagen de secuencia verificada 30873333. Anticuerpos Ki67 se adquirieron de Monosan (Países Bajos), H3 fosfato-histona de Campro Scientific (Países Bajos), anti-sinaptofisina de Dako, anti BrdU de Roche. Anti-GFP de conejo policlonal se proporcionó por Edwin Cuppen, Hubrecht Institute.

Generación de suspensión de células de tejido (tumor) humanos.

[0221] Mediante el uso de una cuchilla de afeitar, se mezcla tejido humano recién aislado (tumor) en la medida posible. Esto se realiza en un medio libre de suero. Se coloca el tumor triturado en una pipeta de 25 ml. Se coloca la solución en un tubo cónico de 50 ml. Se incuba a 37°C durante 30 a 60 min después de la adición de colagenasa IV (200units/ml) (Sigma). La concentración final debe ser de 200 unidades/ml. Se pipeta hacia arriba y hacia abajo dos veces cada 10 min (aprox). Se pasa la solución a través de un filtro (tamaño de poro de 45 micrómetros; Becton Dickinson). Se lava el filtro con 4-5 ml de medio libre de suero. Se centrifuga la solución @ 1500 rpm durante 10 min (4°C). Se resuspende el precipitado en cloruro de amonio hipotónico (aprox. 5 ml). Se deja reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente (esto dará lugar a lisis de células rojas de la sangre). A continuación, se añade un volumen igual de medio libre de suero y se centrifuga de nuevo. Se resuspende el gránulo en medio libre de suero. Si es grumoso, se pasa a través de otro filtro. Cuento con azul de tripano para ver el porcentaje de células muertas.

Ensayo de células madre cancerosas de xenoinjerto en ratones inmunodeficientes

[0222] Los ratones se irradian subletalmente con 320 Rad. El procedimiento experimental consiste en inyectar suspensiones (colon) de células cancerosas humanas bajo la cápsula renal de ratones NOD/SCID. Los ratones se

manejan utilizando técnicas estériles y se anestesiaron con anestesia por inhalación: isoflurano. Los ratones se colocan en una almohadilla de calefacción durante el procedimiento.

[0223] Una cortadora se utiliza para afeitar el abdomen, preparándose después secuencialmente con: (1) solución basada en yodo y (2) solución de etanol al 70%. El área se limpió después con una gasa. El ratón se coloca en su lado (lado izquierdo hacia arriba). Una incisión en el flanco de 1 cm (aproximadamente) se hace con tijeras, justo por debajo del margen costal en el lado izquierdo. Se entrega el riñón en la herida. La suspensión de células a ensayarse para la actividad de las células madre cancerosas se mezcla 1:1 (medio: Matrigel) en hielo. Utilizando una jeringa de tuberculina, se inyecta 25 microlitros de la suspensión celular bajo la cápsula renal. Se entrega el riñón nuevo en el abdomen. Si la actividad de células madre cancerosas está presente en la suspensión celular, un tumor va a crecer en las subsiguientes semanas/meses analizándose por la histología y debe parecerse al tumor humano original.

[0224] El epitelio intestinal es el tejido más rápido de auto-renovación en los mamíferos adultos. Los modelos actuales indican que las células madre de 4-6 criptas residen en la posición +4 inmediatamente por encima de las células de Paneth en el intestino delgado; células madre de colon permanecen sin definir. *Gpr49/Lgr5* se seleccionó de un grupo de genes diana intestinales Wnt para su expresión de cripta restringida. Dos alelos knock-in revelaron expresión exclusiva de *Gpr49* en el ciclo, las células columnares en la base cripta. Además, *Gpr49* se expresó en células raras en varios otros tejidos, incluyendo el estómago, pecho y folículo piloso. El uso de un alelo knock-in Cre inducible y cepa reportera Rosa26-*LacZ*, experimentos de seguimiento de linaje se realizaron en ratones adultos. La célula columnar de base de cripta *Gpr49+ve* (CBC) generó todos los linajes epiteliales durante un período de 60 días, lo que implica que representa la célula madre del intestino delgado y el colon. El patrón de expresión de *Gpr49* muestra que marca las células en múltiples tejidos adultos y cánceres madre.

[0225] El epitelio de absorción del intestino delgado se ordena en criptas y vellosidades¹ (Referencias 2). En el ratón, el epitelio del intestino delgado da la vuelta cada 3-5 días. La tasa masiva de la producción de células en las criptas se equilibra con la apoptosis en las puntas de las vellosidades. Hasta la fecha, las células madre intestinales no han sido funcionalmente identificadas, debido a la falta de marcadores únicos y la ausencia de ensayos de células madre. El análisis de las quimeras de ratón y clones somáticos inducidos por un mutágeno^{2,3} (Referencias 2) y el estudio de la regeneración después de la lesión habría permitido una definición operativa de las características de células madre. Se cree que las células madre se ciclan de manera constante para producir las células de amplificación de tránsito de proliferación rápida (TA), capaces de diferenciarse hacia todos los linajes. Las células madre se autorenuevan durante toda la vida, y regenerar el epitelio después de una lesión. El número estimado de células madre es de entre 4 y 6 por cripta² (Referencias 2). La retención de etiquetas de ADN a largo plazo ha localizado provisionalmente las células madre en la "posición" +4 directamente por encima de las células Paneth⁴ (Referencias 2). Tres tipos diferenciados de células (enterocitos, células caliciformes y células neuroendocrinas) forman a partir de células de TA en la unión cripta-vellosidad y continúan su migración en estiramiento de bandas coherentes a lo largo del eje cripta-vellosidad. Mientras que criptas son monoclonales, cada vellosidad recibe células de múltiples criptas diferentes y es por lo tanto policlonal. El cuarto tipo de célula principal diferenciado, la célula de Paneth, reside en la parte inferior de cripta. El epitelio de colon contiene criptas, pero tiene una superficie plana en lugar de llevar vellosidades. Este epitelio se compone de dos grandes tipos de células diferenciadas: los colonocitos de absorción y las células caliciformes¹ (Referencias 2). Hasta la fecha, no hay células madre que han sido identificadas en el colon.

[0226] Dado que las señales Wnt constituyen la principal fuerza impulsora detrás de la biología de las criptas⁵ (Referencias 2), hipotetizamos que uno o más de genes diana Wnt/TCF4 (TCF7L2) pueden expresarse específicamente en las células madre. Hemos descrito previamente el programa de gen diana Wnt/TCF4 en células de cáncer colorrectales y se encontró que se expresaba fisiológicamente en las criptas intestinales^{6,7} (Referencias 2). Cuando se estudió la expresión de aproximadamente 80 genes diana⁷ seleccionados Tcf4, la inmensa mayoría se expresó tanto en las células de Paneth como en las células TA. El gen *Gpr49/Lgr5*, sin embargo, se expresó de una manera única. El gen *Gpr49* se comportó como un gen diana de Wnt, ya que su expresión se extinguió en la inhibición inducida de actividad de la vía Wnt por TCF4 dominante negativo en la línea celular LS174T de cáncer colorrectal humano, un sistema de células descrito anteriormente⁶ (Referencias 2) (Fig. 1a, carril 1 frente a 2). De acuerdo con ello, el gen se expresó en las criptas, pero no las vellosidades, de ratón intestino delgado (Fig1a, carril 3 frente a 4). Hibridación *in situ* reveló la expresión en un número limitado de células situadas en todos los fondos de las criptas, así como en adenomas en el intestino delgado de un ratón *APC^{min}* (Fig. 1b y c). Este patrón de expresión, ampliado en la figura 2c, claramente diferente del obtenido con un gen específico de las células Paneth (Fig 2a) o un gen TA-específico (Fig 2b). El gen *Gpr49* apareció para marcar células pequeñas intercaladas entre las células de Paneth, las células de ciclo columnar de base de cripta (CBC) (Fig. 2d-h; véase más adelante).

[0227] *Gpr49* codifica un receptor huérfano acoplado a proteína G (GPCR), que se caracteriza por un gran dominio extracelular rico en leucina. Está estrechamente relacionado con GPCRs con ligandos de glicoproteínas, tales como receptores TSH-, FSH y LH⁸ (Referencias 2). *Gpr49* estaba en la lista original de los objetivos Tcf4 en el cáncer colorrectal⁶, pero después se sido observado que también se sobreexpresa en los carcinomas de ovario y hepatocelulares^{9,10} (Referencias 2). Con el fin de estudiar su expresión en detalle obtuvimos un alelo knock-in, en el que *LacZ*, precedido por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), se integra solo N-terminal al primer dominio

de transmembrana esencialmente creando un alelo nulo (Fig. 3a).

[0228] Mientras que nuestro estudio estaba en marcha, Morita *et al* publicaron el *Gpr49*^{-/-} fenotipo¹¹ (Referencias 2). Una malformación de la lengua y la mandíbula inferior provoca que mutantes nacidos traguen grandes cantidades de aire que conducen a su desaparición poco después del nacimiento. Se observó el mismo fenotipo en nuestros ratones. Es de destacar que criptas y las células madre intestinales se establecieron por primera vez varias semanas después del nacimiento¹² (Referencias 2). Los ratones de heterocigoto *Gpr49-lacZ* nos permitieron detallar la expresión de *Gpr49*. Antes del nacimiento, se observó un patrón de expresión dinámico y complejo (Barker *et al*, en preparación). Próximamente al nacimiento, la expresión de *Gpr49* se disminuyó en casi todos los tejidos. En los ratones adultos se restringió a las células raras, dispersas en el ojo, el cerebro, folículo piloso, glándula mamaria, los órganos reproductores, el estómago y el tracto intestinal (Fig 3, y no mostrado). En el intestino delgado, se observó la expresión de *Gpr49* en células delgadas situadas entre las células de Paneth en el intestino delgado (Fig 3b y c), y en un número similar de células en la parte inferior de las criptas del colon (Fig 3d y e). El recuento de células azules en pequeñas criptas intestinales seccionadas a través del lumen reveló la presencia de aproximadamente 3,5 de tales células por cripta en sección (Fig 2i, barra blanca). Hace más de 30 años, Leblond y Cheng señalaron la presencia de células de ciclo entre las células de Paneth y se ha empleado el término células "Columnares de Base de Cripta" (CBC)¹³ (Referencias 2). Sobre la base de su posición y su presencia en los clones mutantes epiteliales a largo plazo, Cheng y Bjerknes^{2,14} (Referencias 2) y Gordon y otros¹⁵ (Referencias 2) han propuesto que estas células pueden albergar actividad de las células madre

[0229] Por la morfología, las células delgadas CBC *Gpr49*^{+ve} con su escasa citoplasma y núcleos planos, en forma de cuña que apuntan hacia el lumen de las criptas eran fácilmente distinguibles de las células de Paneth adyacentes. De vez en cuando (una vez en aproximadamente cada diez criptas), estas células también expresan el marcador de fase M de fosfo-histona H3, lo que indica que las células están en ciclo (Fig 2f). De hecho, un pulso de 4 horas de BrdU etiquetado aproximadamente 1 de estas células por cripta (Fig 2g y 2l, barra negra izquierda), mientras que un etiquetado de BrdU continuo de 24 horas resultó en más de 3 células positivas por cripta (Fig 2h y i, barra negra derecha), cerca del número total de células CBC por cripta (Fig 2i, barra blanca). Esta observación implica que el tiempo medio de ciclo de las células es CBC en el orden de 1 día. La colocación directa del marcador de proliferación Ki67 con *Gpr49-LacZ* confirmó además que las células CBC *LacZ* positivas son típicamente de ciclo (Fig 2e y Fig 9).

[0230] Con el fin de ser capaz de visualizar las células CBC vivas y estudiar su "tronicidad" potencial, generamos otro alelo knock-in, en el que hemos integrado un casete EGFP-ires-CreERT2 en el primer codón ATG de *Gpr49* (Fig. 4a y Fig. 6). Ratones heterocigotos que llevan este alelo eran sanos y fértiles. El patrón GFP observado en tejidos adultos fielmente recapitula el patrón visto anteriormente con el alelo *Gpr49-LacZ* en el ojo, cerebro, folículo piloso, glándula mamaria, los órganos reproductivos, el estómago y el tracto intestinal (no mostrado, y Fig 4). La formación de imágenes confocal permite la visualización de las células *Gpr49*^{+ve} por fluorescencia de GFP en el intestino delgado (Fig 4b, c, e) y colon (Fig 4f). La microscopía inmuno-electrónica utilizando marcaje de inmunooro de las células CBC GFP-positivas y de las células de Paneth y fibroblastos ilustraron la anatomía única ultraestructural de las células CBC (Fig 4g y h). Típicamente, las células CBC eran relativamente anchas en su base, contenían un núcleo en forma de cuña plana y orgánulos escasos. Una extensión delgada de citoplasma apical se apretó entre las células Paneth granulares de retículo y ricas en endoplasmático, extendidas al lumen de cripta y llevaron algunas microvellosidades apicales.

[0231] A continuación, cruzamos el alelo knock-in *EGFP-ires-CreERT2* con el *Rosa26-lacZ* reportero activable por Cre¹⁶ (véase la Fig 4a para la estrategia experimental). La inyección de tamoxifeno activa la enzima de fusión CreERT2 en células que expresan *Gpr49*. La escisión mediada por Cre de la secuencia de control de carretera en el *Rosa26-lacZ* reportero debe después irreversiblemente marcar las células *Gpr49*^{+ve}. Por otra parte, mientras que la progenie potencial de estas células ya no expresa GFP, el *LacZ* reportero activado debe actuar como una marca genética, lo que facilita el seguimiento de linaje.

[0232] La expresión de *LacZ* no se observó en los ratones no inducidos (no mostrados). Para cuantificar el número total de células CBC por cripta donde la enzima Cre latente podría activarse por el tamoxifeno, se trataron los ratones de 2-3 meses de edad con tamoxifeno y se sacrificaron los ratones 12 horas después. Como es evidente en la Fig 5a, señales *LacZ* azules aparecieron en las posiciones típicas de CBC. Se determinó la frecuencia donde las células azules aparecieron en posiciones específicas en relación con la parte inferior de cripta, según el esquema en la Fig 5b. La gran mayoría de las células CBC marcadas *LacZ* de Cre^{+ve}, ocurrieron en las posiciones entre las células de Paneth, mientras que sólo el 10% de estas células se observaron en la posición 4 directamente por encima de las células (Fig 5b, línea azul). Los datos cuantitativos sobre la posición de las células de la etiqueta de retención de ADN obtenidas a largo plazo en ratones después de la irradiación de adultos (que marcan las células madre intestinales "4") se publicaron recientemente por Potten y otros¹⁷. La comparación de estos datos (Fig 5b, línea roja) con la posición de las células CBC con Cre activable reveló que los dos marcadores identificaron poblaciones de células que en gran parte no se solapan.

[0233] Otra característica definitoria de la célula +4 es su exquisita sensibilidad a dosis bajas (<1Gy) de radiación⁴. Para comparar la sensibilidad relativa a la radiación entre células CBC y células +4, los ratones adultos fueron

irradiados con 1 Gy o 10 Gy y posteriormente se sacrificaron 6 horas más tarde, al pico de apoptosis. Células activas caspasa-3-positivas se visualizaron por inmunohistoquímica (Fig 7a). La frecuencia de células positivas por cripta se determinó contando las células apoptóticas en tres clases: las células CBC (definidas por su ubicación entre las células de Paneth), células +4 (situadas directamente encima de las células de Paneth) y células TA: situadas en la posición 5-15 (Fig. 7b). Apoptosis máxima en la posición 4 ya se alcanzó a 1 Gy (a: panel superior, flechas negras) en concordancia con (Referencias 2), mientras que 10 Gy causó significativamente más apoptosis de 1 Gy de irradiación en CBC (a: panel inferior) y células TA, lo que confirma las diferentes identidades del CBC y células +4.

[0234] Los ratones adultos se sometieron a un pulso de Tamoxifeno y se sacrificaron a 1, 5, 12 (no mostrado) y 60 días después de la inducción. Un día después de la inducción, se observaron células CBC ocasionales en las criptas del intestino delgado y el colon para expresar LacZ (Fig 5c y 5i, respectivamente). Como se demuestra por todo el montaje en el intestino delgado en la Fig 8, cintas paralelas de células surgidas desde las partes inferiores de las criptas y corrieron por el lado de las vellosidades adyacentes en momentos posteriores. La cinética de formación de banda no era uniforme. Algunas rayas ya llegaron a la punta de las vellosidades 5 días después de la inducción, mientras que la tinción azul en las criptas de vez en cuando todavía se restringió a las criptas. A los 5 días después de la inducción (Figura 5d), dicha expresión restringida en la cripta se ve muy raramente. Las células CBC eran capaces de mantenimiento a largo plazo del epitelio de auto-renovación, ya que en los intestinos de 60 días (Fig 5e y Fig. 8) la frecuencia de las criptas y las cintas azules eran esencialmente idénticas a las observadas a los 5-12 días post-inducción.

[0235] El doble etiquetado de intestino inducido por 60 días demostró la presencia de células caliciformes PAS-positivas (Fig 5f), células PAS-positivas de Paneth (Fig 5g) y células enteroendocrinas sinaptosina-positivas (Fig 5h) en los clones LacZ-manchados procedentes de células CBC *Gpr49*⁺^{ve}. El uso de marcado mutacional, Cheng y Bjerknes han informado de la existencia de diferentes tipos de clones de larga vida epiteliales, es decir, clones (enterocitos) columnares, clones (caliciformes) mucosos y clones mixtos². Los clones observados en nuestro estudio eran exclusivamente de la variedad mixta. En clones azules, la frecuencia de células caliciformes (114 de 2043 células totales contadas), enterocitos (1846/2043) y células de Paneth (83/2043) eran comparables a la frecuencia de las células caliciformes (127 de cada 3691 células totales contadas) enterocitos, (3345/3691) y células de Paneth (127/3691) en el epitelio adyacente sin marcar. Como se ha señalado 2 (Referencias 2), el tercer tipo de células secretoras, la célula enteroendocrina, era demasiado rara para permitir la enumeración precisa. En conjunto, llegamos a la conclusión de que el células CBC *Gpr49*⁺^{ve} representan las verdaderas células madre del intestino delgado.

[0236] El análisis del colon produjo observaciones esencialmente idénticas. Las células *Gpr49*⁺^{ve} produjeron clones azules que emanan del fondo de cripta (Fig 5i). Estos clones contenían colonocitos así como las células caliciformes, y esencialmente se mantuvo sin cambios durante los 60 días de persecución (Fig 5j, k). Una diferencia significativa con la situación en el intestino delgado implicó la cinética de formación del clon. A los 5 días, la tinción de azul en la mayoría de las criptas era todavía restringida al fondo y criptas completamente azules fueron observadas sólo en raras ocasiones, lo que implica que las células madre de colon eran más a menudo de reposo que sus contrapartes pequeñas intestinales. En días posteriores, el número relativo de criptas totalmente azules se aumentó. Llegamos a la conclusión de que las células del colon *Gpr49*⁺^{ve} cumplen los requisitos de células madre pluripotentes y capaces de mantener auto-renovación epitelial durante largos períodos de tiempo.

[0237] Nuestras observaciones proporcionan la caracterización definitiva de la célula madre intestinal por el seguimiento de linaje usando la expresión de un único gen marcador, *Gpr49*. Las células pequeñas *Gpr49*⁺^{ve} intestinales generalmente no son de reposo, pero son de ciclo rápido, como se evidencia por la expresión de Ki67 y H3 fosfo-histona, la incorporación de BrdU, y por la cinética de la formación de la cinta. Las células *Gpr49*⁺^{ve} del intestino delgado aparecen dividiendo más activamente que sus homólogos del colon, probablemente reflejan las diferencias en la tasa de recambio epitelial entre los dos órganos. Parece poco intuitivo ese ciclo de las células madre. Esto es, sin embargo, no sin precedentes. Las células madre germinales del testículo *Drosophila* y ovario de la mosca, podría decirse que las células madre adultas se entienden mejor en los animales, ciclan durante toda la vida de la mosca adulta¹⁸ (Referencias 2). Del mismo modo, un elegante estudio reciente demostró que las células madre adultas de la piel de los mamíferos son el ciclo de forma continua¹⁹ (Referencias 2).

[0238] Las células en ciclo +4 han sido previamente propuestas por Potten y otros para representar a las células madre pequeñas intestinales⁴ (Referencias 2), una noción no se ha confirmado aquí. La noción se basa en la observación de que una etiqueta de ADN incorporada durante los períodos de actividad de células madre altas se mantuvieron específicamente en las células en la posición 4. La retención de etiquetas a largo plazo se utiliza a menudo como una estrategia indirecta para identificar las células madre¹² (Referencias 2). Cabe señalar, sin embargo, que las células que se diferencian terminalmente conservan también las etiquetas de ADN y por lo tanto que la retención de etiquetas debe interpretarse con precaución. Estudios previos han propuesto otros marcadores de células madre intestinales. Musashi^{20,21} (Referencias 2) y CD133²² (Referencias 2) en nuestras manos manchan hasta 30-50 células por cripta (no mostradas), que aparecen para abarcar las células CBC, así como células de amplificación temprana de tránsito. Li y otros han descrito diversos marcadores moleculares de las células +4, incluyendo fosfo-PTEN, fosfo-AKT y 14-3-3²³ (Referencias 2). Nuestro estudio indica que la validez de estos marcadores de células madre putativas debe reconsiderarse.

[0239] Parece bastante singular que las células madre adultas pueden identificarse en base a la expresión de un solo gen. Este fenómeno no puede limitarse al intestino, ya que observamos expresión *Gpr49* muy restringida en una variedad de otros tejidos. En el folículo del pelo anagen, el gen *Gpr49* se expresa en el área de protuberancia, así como en la vaina externa de la raíz (Fig 3i). Mientras que las células madre quiescentes LTR residen exclusivamente en la protuberancia, células madre activadas migran a través de la vaina externa de la raíz hacia las papilas basales²⁴⁻²⁶ (Referencias 2). De hecho, se informó recientemente que *Gpr49* era el segundo gen más altamente regulado hacia arriba según la evaluación de la expresión diferencial de poner en orden células madre aisladas del folículo piloso²⁷ (Referencias 2). Por otra parte, experimentos de seguimiento de linaje preliminar en el folículo piloso apoyan la noción de que células *Gpr49+ve* representan células madre (Barker, Clevers y Toftgard, no publicado). Aunque patrones de la proliferación en las glándulas del estómago han indicado que las células madre epiteliales residen en el istmo, a medio camino entre la base de empaquetadura y la superficie epitelial²⁸ (Referencias 2) encontramos *Gpr49* expresada en partes inferiores de las glándulas (Fig 3f,g). Experimentos de seguimiento de linaje implican que las glándulas enteras se derivan de estas células (Barker y Clevers, no publicado). En la glándula mamaria, las células madre residen en la capa basal del epitelio 29 (Referencias 2), donde se observa la expresión de *Gpr49* (Fig 3h). *Gpr49* puede así representar un marcador más general de las células madre adultas. Si es verdad, los modelos de ratón desarrollaron en el curso de este estudio permitirán el aislamiento, así como la modificación genética específica de las células madre adultas vivas en una variedad de órganos. Primero identificamos *Gpr49* como un gen expresado en células de cáncer de colon⁶ (Referencias 2). Se expresa en otros tipos de cáncer⁹, (Referencias 2) y, como se describe en el presente estudio, también en adenomas de ratón premalignas. Sobre la base de las observaciones reportadas aquí, ahora sabemos que *Gpr49* puede marcar las células madre cancerosas ("células iniciadoras del tumor") en los adenocarcinomas colorrectales.

Ejemplo 2 Expresión tisular *Lgr5* y evidencia de células madre *Lgr5+* en estos tejidos

Materiales y métodos

[0240] Para detalles experimentales, nos referimos a los materiales y métodos tal como se utiliza en el ejemplo 1

Resultados y discusión

Expresión *Lgr5* también se detectó en el cerebro, la retina, el hígado y la glándula adrenal

[0241] Se estudió la expresión *Lgr5* en múltiples otros tejidos en los ratones portadores de *lacZ* integrados en el último exón del gen *Gpr49*, la eliminación de todas las regiones transmembranas de la proteína *Gpr49* codificada. Se determinó que, análogamente al colon y el intestino delgado, células *Lgr5+* se detectaron en el cerebro, la retina, el hígado y la glándula adrenal (Fig 12). En ratones adultos, *Lgr5* se limita a poblaciones de células raras en el cerebro (glomérulos del bulbo olfatorio y varias otras regiones mal definidas), el ojo (capa nuclear interna de la retina), el hígado (células que rodean a las tríadas portales) y la glándula adrenal.

Seguimiento de linaje en el estómago, glándula mamaria y la glándula suprarrenal demuestra que *Lgr5* está marcando poblaciones de células madre en estos tejidos

[0242] Se utilizaron los ratones *Lgr5KI/Rosa26-lacZ*¹⁶ (Véase el ejemplo 1 para la estrategia experimental) para estudiar la presencia de células madre *Lgr5+* en varios otros tejidos. La inyección de tamoxifeno activa la enzima de fusión CreERT2 en células que expresan *Gpr49*. La escisión mediada por Cre de la secuencia de control en el reportero *Rosa26-lacZ* debe irreversiblemente marcar células *Gpr49+ve*. Por otra parte, mientras que la progenie de potencial de estas células GFP ya no se expresa, el reportero *LacZ* activado debe actuar como una marca genética permanente, que se transmitirá a cualquiera de los descendientes de células *Lgr5+ve*, lo que nos permite un seguimiento de su apariencia y destino in-vivo.

[0243] El seguimiento de linaje se inició en los ratones *Lgr5KI/Rosa26-lacZ* jóvenes y el epitelio del estómago analizó la actividad de *LacZ* después de 6 meses. Las células *Lgr5-lacZ* positivas están restringidas inicialmente a la base de las glándulas (Fig. 13a). Después de 6 meses, varias glándulas enteramente *lacZ*-positivas son visibles en todo el estómago (Fig. 13b), que demuestran que las células *Lgr5+ve* son capaces de generar todos los tipos de células en el epitelio glandular durante largos períodos de tiempo.

[0244] Experimentos de seguimiento de linaje se realizaron y el epitelio de la glándula mamaria se analizó para la actividad para *LacZ* durante un período de 3 meses. Las células *Lgr5-lacZ* positivas están restringidas inicialmente a las células epiteliales basales raras en las glándulas vírgenes (Fig. 14a). Después del embarazo, las células *LacZ*-positivas son visibles en el epitelio basal de las glándulas productoras de leche recién formadas (Fig. 14b). Esto demuestra que células *Lgr5+* en la glándula mamaria son células madre mioepiteliales.

[0245] El seguimiento de linaje en las glándulas suprarrenales analizadas para la actividad *LacZ* durante un período de 3 meses. Las células *Lgr5-lacZ* positivas están restringidas inicialmente a la periferia de la glándula suprarrenal 5 días después de la inducción (Fig. 15a). Después de 3 meses la mayoría de la médula suprarrenal es *LacZ* positiva (Fig 15b). Esto sigue siendo positivo durante un período de 14 meses (no se muestra). Esto demuestra que las

células Lgr5+ son las células madre de la médula suprarrenal.

Ejemplo 3 Expresión tisular Lgr6 y expresión Lgr6 en las células madre relacionadas

5 Material y métodos

Ratones transgénicos y tratamientos.

10 **[0246]** Ratones *Lgr6-EGFP-ires-CreERT2* fueron generados por recombinación homóloga en células madre embrionarias orientadas a un casete *EGFP-IRES-CreERT2* a la ATG de *Lgr6*. Ratones *Rosa26-lacZ* reportero se obtuvieron del laboratorio Jackson. Los animales fueron alimentados *ad libitum*. La recombinasa Cre se activó en ratones *Lgr6-EGFP-Ires-CreERT2/Rosa26-LacZ* mediante la inyección de 200 µl de tamoxifeno (10 mg/ml disuelto en aceite de girasol) por vía intraperitoneal.

15 *Análisis confocal de la expresión de EGFP*

[0247] Para imágenes confocales las muestras de piel se fijaron en formalina durante 15 minutos a TA y se introdujeron en 4% de agarosa de baja fusión. Secciones longitudinales de espesor entre 100 y 200 µm se prepararon usando un vibratoma. Secciones se permeabilizaron en PBS suplementado con 1% de BSA + 1% de DMSO + 0,1% TritonX, se tiñeron durante 30 minutos con TOPRO 1: 1000 dilución (Molecular Probes) y se incluyeron utilizando Vectashield (Vector Labs). Las secciones fueron fotografiadas con un microscopio confocal Sp2 (Leica) y se procesaron utilizando software Volocity y Photoshop CS2.

Detección de la actividad beta-galactosidasa

25 **[0248]** Tejidos obtenidos recientemente se fijaron durante 2 horas en 1% de formaldehído/0,2% de glutaraldehído/0,02% NP40 en solución PBS0 a 4°C en una plataforma de balanceo. Las muestras se lavaron 3 veces durante 20 min con tampón de enjuagado (2 mM MgCl₂/0,02% NP40/PBS0) y se tiñeron para 36 a 48 h en una solución que consiste en 1 mg/ml de X-gal, 5 mM ferrocianuro, 5 mM ferritocianuro, 0,1% desoxicolato de sodio en tampón de enjuague. El sustrato se retiró y las muestras se lavaron dos veces en PBS0 durante 20 min a temperatura ambiente en una plataforma de balanceo. Los tejidos se fijaron durante la noche en 4% PFA en PBS0 a 4°C en la oscuridad en una plataforma de balanceo. El PFA se retiró y los tejidos se lavaron dos veces en PBS0 durante 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se incluyeron en parafina, se seccionaron (4 µm) y se contratiñeron con rojo neutro.

35 Resultados y discusión

40 **[0249]** Para caracterizar la expresión de *Lgr6* en la piel se utilizó un ratón knock-in, en el que el promotor *Lgr6* controla la expresión de EGFP y la proteína de fusión CreERT2, denominada *Lgr6-EGFP-ires-CreERT2*. En P25 cuando los folículos pilosos (HFS) están en la fase de crecimiento (anágena), las células GFP-positivas fueron localizadas a las células de la zona de abultamiento superior/istmo del HF (Fig 16A, C) y las células basales de la epidermis interfollicular (IFE, Fig 16A, B). Este patrón de expresión sugiere que la expresión *Lgr6* marca una población de células SC/población celular de progenitores tempranos del folículo del pelo y la epidermis.

45 **[0250]** Para hacer frente a la cuestión de si las células *Lgr6+* del anágeno HF e IFE representan células madre funcionales, ratones de 20 días de edad *Lgr6-EGFP-Ires-CreERT2/Rosa26-lacZ* fueron inyectados con tamoxifeno. En P20 *Lgr6* se expresa en la zona de protuberancia superior/istmo de la HF y las células basales del IFE (datos no mostrados). Tres días después de la inyección de tamoxifeno, un patrón disperso de células marcadas se podía ver en las FCs y el IFE (Fig. 17B). A los 18 días después de la inyección la progenie de células *Lgr6+* se podía ver en las FCs anágenas (Fig. 17C, D), así como en el IFE y las glándulas sebáceas (SG) (Fig. 17C, D). En el siguiente células marcadas con telógeno se encontraron en la protuberancia y en el istmo (Fig. 17E, F) y el IFE y SGs (Fig. 17E, F). Esta observación sugiere fuertemente que células *Lgr6+* situadas en la zona de protuberancia/istmo de la HF y las IFE basales exhiben propiedades de células madre. En particular, Células *Lgr6+* pueden contribuir a todos los apéndices de la piel, es decir, creciente HFS, IFE y SG.

55 **[0251]** Parece bastante singular que las células madre adultas se pueden identificar sobre la base de la expresión de un único gen, en este caso *Lgr6*. Este fenómeno no puede restringirse a la piel, ya que se observa la expresión altamente restringida de *Lgr6* en una variedad de otros tejidos. Para hacer frente a la cuestión de si las células *Lgr6+* representan células madre funcionales en cualesquiera otros tejidos de ratones de 20 días de edad *Lgr6-EGFP-ires-CreERT2/Rosa26-lacZ* fueron inyectados con tamoxifeno. Tinción LacZ se realizó en 18 y 32 días después de la inyección de tamoxifeno para evaluar el seguimiento de linaje en una variedad de tejidos. Curiosamente, las células LacZ positivas estaban presentes en el mioepitelio subyacente a los bronquiolos del pulmón en ambos puntos de tiempo (Fig. 18). Por lo tanto, las células *Lgr6+* contribuyen al mioepitelio del pulmón sugiriendo fuertemente que las células *Lgr6+* ubicadas en el pulmón exhiben también las propiedades de células madre.

65 Ejemplo 4 El papel de células madre cancerosas Lgr5+ en adenoma

[0252] La anatomía de la cripta intestinal es especialmente adecuada para estudiar las células madre adultas en su nicho. El epitelio del intestino delgado murino se renueva cada cinco días^{1,2} (referencias 5). Proliferación vigorosa ocurre dentro del compartimiento de cripta. Recientemente hemos identificado células delgadas, no diferenciadas que expresan el gen *Lgr5* situado en partes inferiores de las criptas como las células madre del intestino delgado y el colon. Cada pequeña cripta intestinal contiene aproximadamente 6 células madre independientes, de larga vida que se entremezclan con las células de Paneth en el intestino delgado y con células caliciformes en el colon. Contraintuitivamente, estas células no son inactivas, pero completan un ciclo celular cada día³ (referencias 5). Leblond et al han llamado originalmente estas células morfológicamente células columnares de base de cripta (CBC)^{4,5} (referencias 5). Sus células hijas constituyen el compartimiento de cripta de amplificación de tránsito fácilmente distinguible (TA). Células TA se dividen cada 12-16 horas, lo que genera unas 300 células por cripta cada día⁶ (referencias 5). Células TA recién formadas residen dentro de las criptas de aproximadamente 48-72 horas, sufriendo hasta 6 rondas de división celular durante la migración hacia arriba⁶ (referencias 5). Cuando las células TA comprometidas llegan al cruce de cripta-vellosidad, se diferencian rápida e irreversiblemente. La proliferación se equilibra con la apoptosis en el otro extremo de la cinta transportadora epitelial, la punta de la vellosidad. Sólo las células de Paneth se escapan de este flujo; tienen un tiempo de residencia de 3-6 semanas en la base de cripta⁷⁻⁹ (referencias 5). El inicio de mutación en neoplasias intestinales en componentes diana de ratón y de hombre de la vía Wnt, más frecuentemente el regulador negativo Wnt APC^{10,11} (referencias 5). Esto resulta en la activación constitutiva de un programa de gen diana Wnt que impulsa la formación de adenomas benignos o pólipos¹²⁻¹⁵ (referencias 5). Sin embargo, no está claro qué tipo de célula sostiene la mutación de iniciación de cáncer.

[0253] El ratón A-H-Cre citocromo P450-impulsado por promotor permite la supresión condicional de alelos floxeados en el epitelio intestinal después de la administración del agente inductor, β -naptoflavona (β -NF). Es importante destacar que el alelo A-H-Cre es altamente activo en todos los tipos de células del epitelio, incluyendo las células madre¹⁶ (referencias 5). Hemos empleado previamente un alelo floxeado de APC¹⁷ (referencias 5) en combinación con la línea de ratón A-H-Cre para demostrar que la pérdida aguda de APC en todo el epitelio intestinal de adultos después de la inyección IP de β -NF conduce a una transformación inmediata cuantitativa del epitelio¹⁶ (referencias 5), un proceso casi enteramente dependiente del gen diana Wnt aguas abajo c-MyC¹⁸ (referencias 5). Alta dosis oral β -NF induce más delección estocástica de APC, lo que resulta en la formación de adenoma rápida a lo largo del intestino dentro de 3 semanas¹⁹ (referencias 5). Ambos de estos protocolos de inducción de dosis altas efectúan la delección en todos los compartimentos del epitelio, incluyendo las células madre en la base cripta.

[0254] Después de haber validado el ratón AHCRe/APC^{flox/flox} como un modelo inducible de cáncer intestinal, hemos tratado de diseccionar el mecanismo de la formación de adenoma mediante la identificación de su célula de origen. Razonamos que la administración oral de dosis bajas de β -NF restringiría su campo de acción a las células en las vellosidades y las regiones superiores de las criptas. El ajuste cuidadoso de la dosis requerida reveló que después de la administración oral de 1 mg/kg β -NF, la eficiencia de la activación de Cre en las células madre en la base de cripta era extremadamente baja, tal como se mide por la frecuencia insignificante del seguimiento de linaje a largo plazo iniciado en ratones AHCRe/R26R que reciben esta dosis. Esta dosis era todavía muy eficiente en la inducción de la actividad de Cre en el compartimiento TA y de epitelio de vellosidades, tal como se detectó utilizando el ratón Rosa26-LacZ²⁰ (referencias 5) como un reportero Cre (Fig. 19a, b). En un experimento típico sobre el 70% de las vellosidades contenía células azules 2 días después de la inducción, pero al día 7 la tinción con azul ya no se pudo detectar. De acuerdo con esto, ningunas cintas de cripta/vellosidad se detectaron en el día 100 después de la inducción (Fig 19c).

[0255] Al utilizarse este régimen de dosificación en AHCRe/APC^{flox/flox}/ratones R26R, se hicieron visibles múltiples focos β -catenina^{altos}/lesiones rápidamente a lo largo de la cripta superior y el epitelio de las vellosidades. Imágenes representativas tomadas en el día 3 después de la inducción se dan en la Fig 20. Focos mutantes APC evidentes por niveles altos de β -catenina ocurrieron predominantemente en los cruces de las criptas-vellosidades, pero también se observaron en las vellosidades (Fig 19d). Muy poco frecuentemente estas lesiones también se vieron cerca de la base de cripta.

[0256] La mayoría de las células APC-deficientes presentes en el epitelio de las vellosidades se perdieron después de 4-5 días, presumiblemente por vertimiento. Las lesiones/focos lacZ-positivas APC deficientes restantes presentes dentro de las criptas no se expandieron durante un periodo de 24 días. Un ejemplo típico de una lesión de este tipo se da en la Figura 20e. Ningún adenoma macroscópico era visible en este paso. Sorprendentemente, estas pequeñas lesiones persistieron durante un periodo de 180 días (Fig 20g), y sólo en muy raras ocasiones progresaron a pequeños adenomas, los cuales no se expandieron más allá de 2-3 vellosidades (Fig 20f, h). Esto estaba en marcado contraste con la formación de alta frecuencia de adenomas grandes iniciados en ratones AHCRe/APC^{flox/flox} después de altas dosis de inducción β -NF. Esto sugirió que la gran mayoría de los adenomas en estos últimos ratones resultaron de la pérdida de APC en células madre.

[0257] Con el fin de demostrar formalmente que la transformación de las células madre intestinales es la principal vía para la formación de adenoma, empleamos nuestros ratones knock-in *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* como una línea Cre específica de células madre para eliminar de manera inducible la APC floxeada. Con este fin, se generaron ratones *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* x APC^{flox/flox}. En estos ratones, la enzima Cre específica a células madre se activó

con una sola inyección IP de tamoxifeno (Fig 21a). Cambios fenotípicos posteriores en el intestino se siguieron durante un período de 2 meses. La acumulación de proteína β -catenina Wnt-efector se observó primero en células CBC aisladas en la base cripta después de 3 días (Fig.21a). Estas células transformadas eran GFP-positivas, lo que confirma la delección diana de APC en las células madre intestinales (Fig.21b). Después de 5 días, se observó que múltiples criptas tenían células madre transformadas en todo el intestino grueso (es decir, β -catenina^{alta}) en asociación con racimos/bolsillos de células altamente proliferativas de células madre β -catenina^{alta} dentro del compartimento de tránsito de amplificación (TA) (Fig.21c, d). Esto indicaba que las células madre transformadas por Wnt permanecen viables y generan rápidamente una población en crecimiento de la progenie transformada más arriba en las criptas. Ocho días después de la inducción de la delección APC en las células madre, las "bolsas" de células transformadas habían continuado su expansión dentro de las criptas y bolsas/evaginaciones del epitelio de las criptas y pequeñas microadenomas dentro del estroma de las vellosidades asociadas se hicieron evidentes (Figura 21e). Las células con β -catenina acumulada no estaban presentes en el epitelio de las vellosidades en estos ratones, lo que demuestra que el aumento de la población transformada se limita a las criptas intestinales. Estas observaciones son sorprendentemente una reminiscencia de un modelo de formación de adenoma, en el que células transformadas por Wnt que expresan altos niveles del gen diana Wnt EphB2 y -B3 se expanden dentro de la cripta hasta que entran en contacto con el epitelio de las vellosidades Ephrin-positivas^{21,22} (referencias 5). Las fuerzas de repulsión resultantes en consecuencia dictan que el microadenoma sólo puede seguir ampliando al invadir el estroma de las vellosidades donde se encuentran protegidas en el epitelio de vellosidades Ephrin positivas.

[0258] Las "bolsas" y microadenomas presentes en los ratones Lgr5KI/APC^{flox/flox} inducidos en 8 días continuaron su expansión agresiva, como se evidencia por la presencia de múltiples adenomas grandes en todo el intestino 36 días después de iniciar la transformación de células madre (fig 21f).

[0259] Para investigar más a fondo la jerarquía que existe entre las células madre APC-deficientes y su progenie transformada, se analizó la expresión de la proteína marcadora de células madre Lgr5-EGFP durante las diversas etapas de la formación de adenoma en nuestro modelo. En las células madre no transformadas, la expresión Lgr5-EGFP se restringió a las células columnares de base de criptas (CBC) (Fig 22a). La expresión de este marcador de células madre se mantuvo después de la transformación inicial de las células madre después de 3 días (Fig 22b) y también era claramente evidente en las "bolsas" de la progenie transformada recientemente expandida dentro de las criptas después de 8 días (Fig 22c), lo que indica que al menos algún aspecto de "troncalidad" se confirió a estas células. Sin embargo, hubo una marcada regulación hacia abajo de expresión Lgr5-EGFP en los adenomas más grandes presentes en los intestinos de ratones inducidos de 36 días, a pesar de niveles de β -catenina uniformemente altos en todo el tumor (Fig 22d). La expresión Lgr5-EGFP estaba limitada a unas pocas células dispersas dentro de la masa tumoral (Fig. 23). Estas células GFP-positivas retuvieron la morfología delgada, en forma de cuña característica de las células madre intestinales CBC. Por lo tanto, es tentador especular que la expresión Lgr5 en adenomas grandes está marcando una población rara de células madre responsables por estimular su crecimiento continuo. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la transformación de las células madre a través de la pérdida de la APC es una ruta extremadamente eficiente hacia el inicio de la formación de adenoma intestinal. La cinética de este proceso sugiere que ninguna mutación adicional se requiere una vez que ambos alelos *Apc* se pierden en el epitelio intestinal, que es de conformidad con el tejido-tropismo de actividad supresora de tumores de APC.

Ejemplo 5 Generación y uso de anticuerpos dirigidos contra Lgr5 y Lgr6

Materiales y métodos

[0260] Los anticuerpos monoclonales de rata fueron generados por Genovac (Freiburg, Alemania) por inyección intramuscular de las ratas con un plásmido de expresión que expresan cualquiera de Lgr5 o Lgr6 humano. Células B de rata se fusionan con células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se seleccionaron en células HEK293 que fueron transfectadas con plásmidos de expresión Lgr5 o Lgr6 humanos o de ratón.

[0261] Las células L8 (DNTcf4-LS174T) se cultivaron con y sin doxiciclina durante 48 horas. Las células L8 son derivados clonales de células LS174T. En inducción de doxiciclina (DOX) las células L8 expresan una forma dominante negativa de Factor 4 de células T (DNTcf4; véase Roose et al, 1999, Science 285: 1923-1926.). DNTcf4 apaga vía Wnt activa constitutiva. IgG de rata fue utilizado como control de isotipo negativo. Después de 48 horas las células se lavan con PBS frío y se ponen en suspensión utilizando 5 mM EDTA. Todos los pasos siguientes se realizan a 4°C. Las células se bloquean durante 30 min en PBS que contenía 2% de BSA. Reactivo de anticuerpo primario (1°) y secundario (2°) se incubaron posteriormente durante 1 hora, y se lavaron con hielo frío PBS/2% BSA. Para la tinción de anticuerpo primario se utilizó sobrenadante de hibridoma sin diluir, segunda tinción de anticuerpos se realizó utilizando Qdot® 655 de conjugados de IgG anti-rata de cabra F(a-b')₂ (H+L) (Molecular Probes/Invitrogen). Antes de análisis, yodo de propidio se añadió para excluir las células muertas en el análisis.

Resultados

[0262] La especificidad de algunos de los anticuerpos aislados se muestra en las Tablas 4 y 5, como se probó por análisis de FACS. 9G5 es un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra hLgr5. Se determinó el análisis de la

expresión Lgr5 endógena en las células L8. Las células L8 son derivados clonales de células LS174T. Tras la inducción de doxíciclina (DOX), las células L8 expresan Tcf4 dominante negativo (DNTcf4). DNTcf4 apaga vía Wnt activa constitutiva. Esto se refleja en la Fig. 24, que muestra tinción FACS de las células L8 con el anticuerpo 9G5 o anticuerpo de control IgG. Después de 48 horas de la inducción de DOX, se observó una reducción de los niveles endógenos de proteína hLgr5, como también se hace evidente a partir de la reducción en los medios fluorescentes del pico para las células L8 tratadas con doxíciclina.

[0263] Este experimento también se llevó a cabo con anticuerpos Lgr5 específicos 2F10, 10C1 y 6C10. Como se muestra en la Figura 26, se obtienen resultados similares con cualquiera de estos anticuerpos Lgr5 específicos.

Tabla 4. Especificidad de los anticuerpos Lgr5. 9G5 reconoce Lgr5 tanto de ratón como humano Las líneas celulares de cáncer de colon; DLD1 y SW480, LIM1863 no muestran tinción específica para Lgr5. Estos anticuerpos dieron negativos para la reactividad cruzada frente a Lgr4, 6 de ratón y Lgr4 y 6 humana.

	Sobreexpresión mLgr5-293T	Sobreexpresión hLgr5-293T	LS174	L8 (DNTcf4-LS174)
NR 1D9	-	+	+	+
NR 2F10	-	+	+	+
NR 4D11	-	+	+	+
NR 6C10	-	+	+	+
NR 9B3	-	+	+	+
NR 3A4	-	+	+	+
NR 5A7	-	+	+	+
NR 6G2	-	+	+	+
NR 9G5	++	++	++	++
NR 2B8	-	++	++	++
NR 3B9	-	++	++	++
NR 5C8	-	+	+	+
NR 7B11	-	+	+	+
NR10C1	-	+	+	+
NR 4D6	-	+	+	+
NR 5E9	-	+	+	+
NR 8F2	-	++	++	++
NR10F7	-	+	+	+

Tabla 5 Especificidad de anticuerpos Lgr6. Los anticuerpos 1d8 y 3d8 reconocen Lgr6 y hLgr5 de ratón además de Lgr6 humano. Las líneas celulares de cáncer de colon; LS174, DLD1 y SW480 no muestran tinción específica para Lgr6. Estos anticuerpos dieron negativos para reactividad cruzada contra Lgr4, 5 de ratón y Lgr4 humano.

Número de clon	1d8	3d8	6d8	2f4	2h10	5e10
Sobreexpresión hLgr5-293T	+	+	-	-	-	- 10
Sobreexpresión mLgr6-293T	+	+	-	-	-	-
Sobreexpresión hLgr6-293T	++	++	++	++	+	++
LS174	-	-	-	-	-	-
L8 (LS174-DNTcf4)	-	-	-	-	-	-

Ejemplo 6 Análisis de expresión de células madre de colon y de intestino delgado comparadas con su progenie directa

Materiales y Métodos

Aislamiento de las células epiteliales positivas

[0264] Los intestinos delgados o colonos recién aislados se incisaron a lo largo de su longitud y las vellosidades (en el caso del intestino delgado) se eliminaron mediante raspado. El tejido se incubó a continuación en PBS/5 mM EDTA durante 5 minutos. La agitación suave eliminó las vellosidades restantes y el tejido intestinal fue posteriormente incubado en PBS/EDTA durante 30 minutos a 4°C. La agitación vigorosa produjo criptas libres que se incubaron en PBS suplementado con tripsina (10 mg/ml) y ADNasa (0,8 u/μl) durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, las células se centrifugaron, se resuspendieron en SMEM (Invitrogen) y se filtraron a

través de una malla de 40 mM. Las células que expresan GFP se aislaron usando un clasificador de células MoFlo (DAKO).

Análisis de micromatriz

[0265] Se aisló ARN de las fracciones de células GFP^{hi} y GFP^{lo} de intestinos de ratones *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2*. Se marcaron 250 ng de ARN total utilizando un kit de bajo voltaje de entrada lineal de ARN (Agilent Technologies, Pato Alto, CA, EE.UU.). Los protocolos de etiquetado, hibridación y lavado se realizaron de acuerdo con las directrices (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). ARNc marcado diferencialmente de células GFP^{hi} y GFP^{lo} de dos tipos diferentes (cada uno de los cuales combinaba tres ratones diferentes) se combinaron y se hibridaron en micromatrices de doble color de genoma de ratón entero de agilente 4X44K (G4122F) en dos experimentos de intercambio de colorantes, resultando en cuatro matrices individuales. Todos los análisis de datos se realizaron utilizando ArrayAssist (Stratagene Inc, La Jolla, CA, EE.UU.) y Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.). Las intensidades de la señal cruda se corrigieron restando el fondo local. Los valores negativos fueron cambiados por un valor positivo cercano a cero (desviación estándar del fondo local) para permitir el cálculo de razones entre intensidades para las características presentes solamente en una muestra (GFP^{hi} o GFP^{lo}). Los datos se filtraron si ambas intensidades (GFP^{hi} o GFP^{lo}) se cambiaban o si ambas intensidades eran menos de dos veces la señal de fondo y se normalizaban mediante un algoritmo de Loess. El análisis estadístico se realizó mediante la ejecución de una versión de Excel de SAM (Análisis Significativo de Micromatrices) utilizando un complemento de Excel del software (Tusher PNAS 2001, Referencias 6) y "una clase" como el valor de respuesta. Se consideró que los genes se enriquecían significativamente en células GFP^{hi} si tuvieran un valor $q < 0,1$ y donde estuvieran presentes en al menos 3 de 4 matrices y el promedio de los cuatro matrices excedió una ratio log2 de 0,6.

Resultados

[0266] Con el fin de definir un perfil de expresión génica para células madre intestinales Lgr5⁺, se estableció un protocolo para clasificar las células epiteliales GFP-positivas a partir de suspensiones celulares preparadas a partir de criptas recién aisladas de ratones *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* (véase Métodos). Análisis FACS distinguió una población GFP-alta (GFP^{hi}) y una GFP-baja (GFP^{lo}), identificada provisionalmente como células CBC y sus hijas de amplificación de tránsito inmediatas, respectivamente (Figura 25). Un único intestino de ratón rutinariamente produjo varios cientos de miles de células GFP^{hi} y GFP^{lo}. En la Figura 25A se proporciona un ejemplo de una población casi pura de células que expresan Lgr5. Con el fin de identificar nuevos genes de células madre, muestras ARNm de las dos poblaciones se sometieron a perfiles de expresión génica comparativa. El gen que estaba más altamente enriquecido en las células GFP^{hi} era, satisfactoriamente, el propio gen Lgr5. Varios genes en la lista (Tabla 6) ya fueron identificados como genes diana intestinales Wnt previamente, por ejemplo, en el cáncer de colon humano (van der Flier et al, 2007, Gastroenterology 132, 628-632), que validó aún más la lista de genes. Aunque hibridaciones in situ en estos genes diana Wnt normalmente confirmó la expresión de un alto nivel en células CBC, células TA directamente por encima de las células de Paneth también expresaron estos genes, aunque a un nivel mucho más bajo. A modo de ejemplo, la Figura 25B muestra la expresión de Sox9, un gen que responde a Wnt (Blache et al., 2004) crucial para la especificación de células de Paneth (Bastide et al., 2007; Mori-Akiyama et al., 2007).

Discusión

[0267] En el intestino, un conjunto de células madre de ciclo largo de vida larga se define por la expresión de Lgr5, un receptor acoplado a G huérfano sensible a Wnt (Barker et al., 2007, Nature 449, 1003-1007). Estas células Lgr5 + han sido previamente observadas por Leblond y sus colegas, que las denominaron Células Criptográficas Base (CBC) y ya especularon que estas células CBC representan las células madre del epitelio intestinal (Cheng y Leblond, 1974, Am J Anat 141, 461 - 79). Aquí, definimos un perfil de expresión génica mínima para estas células CBC mediante la explotación de ratones knock-in *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* para la clasificación, sobre la base de expresión GFP. Definimos un conjunto de genes expresados de forma diferente entre fracciones GFP^{hi} y GFP^{lo}. En base a imágenes confocales de criptas aisladas, identificamos provisionalmente estas células CBC y sus hijas, respectivamente. Lgr5 se encontró como el gen más diferencial en este conjunto, lo que implica que su expresión está fuertemente restringida a las células CBC. Muchos otros genes en la firma representaban genes previamente dependientes de Wnt identificados, p.ej. *Ascl2*, *CD44*, *Ephb3*, *Sox9* y *Sp5* (van der Flier et al, 2007, Gastroenterology 132, 628 - 632). Dada la íntima conexión entre la señalización de Wnt y la biología de las células madre en muchos tejidos (Reya y Clevers, 2005, Nature 434, 843-850), esto no era sorprendente.

Tabla 6 Análisis de expresión de células madre y su progenie directa

[0268] Firma de intestino delgado (Tabla 6a) y células madre de colon (Tabla 6b) en base a la expresión de Lgr5. Las células epiteliales GFP-positivas de preparaciones de cripta pura de ratones *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* se aislaron usando la clasificación FACS. El análisis FACS distinguió dos poblaciones de células GFP^{hi} y GFP^{lo}, que corresponden a las células CBC y sus hijas de amplificación de tránsito inmediatas, respectivamente. Con el fin de identificar nuevos genes de células madre, las muestras de ARNm de las dos poblaciones se sometieron a perfiles de expresión de genes comparativos mediante el análisis de micromatrices Agilent.

Tabla 6a Comparación células madre del intestino delgado con progenie directa

	Nombre de gen	avg log2 ratio ¹ (gfp ^{alto} / gfp ^{bajo})
5	Lgr5	2,54
	Ephb3	1,38
	Cd44	1,15
	Rnf43	1,14
10	Sox9	1,12
	Slc12a2	0,87
	Ets2	0,80

¹Q valor <0,15

Tabla 6a Comparación células madre del colon con progenie directa

	Nombre de gen	avg log2 ratio ¹ (gfp ^{alto} / gfp ^{bajo})
20	Lgr5	2,98
	Cd44	1,47
	Cdca7	1,23
	Ephb3	1,11
25	Myb	0,81
	Mvc	0,77

¹Q valor <0,05

30 Ejemplo 7 Determinación de secuencia de cadenas ligeras y pesadas, incluyendo regiones CDR, de anticuerpos LGR5 específicos/LGR6 específicos

Materiales y métodos:

35 Secuencia de hibridomas

[0269] Los hibridomas se produjeron como se describe en la sección de materiales y métodos del Ejemplo 5.

[0270] Las secuencias de hibridoma se determinaron a partir de líneas celulares NR de hibridoma clonales Lgr5 específicas y/o Lgr6 específicas 2F10 (véase la Tabla 4) y 6d8 y 2f4 (véase la Tabla 5). El ARN total se aisló usando el reactivo de Trizol y se generó ADNc usando la transcriptasa inversa sobrescrita (Promega). El ADNc se amplificó usando cebadores de PCR diseñados para amplificar las secuencias de Fv-ADN del anticuerpo IgG en una PCR de "toque hacia abajo". Los fragmentos de PCR se clonaron en vectores de clonación PJET1.2 (Fermentas) o PGEM-T (Promega) y posteriormente se secuenciaron usando cebadores específicos de vector en un secuenciador ABI.

45 *Anticuerpo IgG Fc-ADN cebadores PCR de secuencia:*

[0271] Cebadores inversos de la cadena L Kappa; 25 oligos sintetizados individualmente, agrupados, representando 50 variantes:

50	MVK-1	GACATTGTTCTCACCCAGTCTCC
	MVK-2	GACATTGTGCTSACCCAGTCTCC
	MVK-3	GACATTGTGATGACTCAGTCTCC
	MVK-4	GACATTGTGCTMACTCAGTCTCC
	MVK-5	GACATTGTGYTRACACAGTCTCC
55	MVK-6	GACATTGTRATGACACAGTCTCC
	MVK-7	GACATTMAGATRACCCAGTCTCC
	MVK-8	GACATTGCAGATGAMCCAGTCTCC
	MVK-9	GACATTCAGATGACDCAGTCTCC
	MVK-10	GACATTCAGATGACACAGACTAC
60	MVK-11	GACATTCAGATGATTCAGTCTCC
	MVK-12	GACATTGTTCTCAWCCAGTCTCC
	MVK-13	GACATTGTTCTCTCCAGTCTCC
	MVK-14	GACATTGWGCTSACCCAATCTCC
65	MVK-15	GACATTSTGATGACCCARTCTC
	MVK-16	GACATTKTGATGACCCARACTCC
	MVK-17	GACATTGTGATGACTCAGGCTAC

5
10
MVK-18 GACATTGTGATGACBCAGGCTGC
MVK-19 GACATTGTGATAACYCAGGATG
MVK-20 GACATTGTGATGACCCAGTTTGC
MVK-21 GACATTGTGATGACACAACCTGC
MVK-22 GACATTGTGATGACCCAGATTCC
MVK-23 GACATTTTGCTGACTCAGTCTCC
MVK-24 GACATTGTAATGACCCAATCTCC
MVK-25 GACATTGTGATGACCCACACTCC

[0272] Cebador delantero de cadena L Kappa: mck-1A^{ACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGAC}

15 [0273] Cebadores inversos de región variable de cadena H, 25 oligos individualmente sintetizados, representando 88 variantes:

20
25
30
35
40
MVH-1 GCCGGCCATGGCCGAGGTRMAGCTTCAGGAGTCAGGAC
MVH-2 GCCGGCCATGGCCGAGGTSCAGCTKCAGCAGTCAGGAC
MVH-3 GCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGAAGSASTCAGG
MVH-4 GCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTTCAGGAGTCSGGAC
MVH-5 GCCGGCCATGGCCGARGTCCAGCTGCAACAGTCYGGAC
MVH-6 GCCGGCCATGGCCGAGGTCCAGCTKCAGCAATCTGG
MVH-7 GCCGGCCATGGCCGAGSTBCAGCTGCAGCAATCTGG
MVH-8 GCCGGCCATGGCCGAGGYCAGCTGCAGCAGTCTGGRC
MVH-9 GCCGGCCATGGCCGAGGYCAGCTYCAGCAGTCTGG
MVH-10 GCCGGCCATGGCCGAGGTCCARCTGCAACAATCTGGACC
MVH-11 GCCGGCCATGGCCGAGGTCCACGTGAAGCAGTCTGGG
MVH-12 GCCGGCCATGGCCGAGGTGAASSTGGTGGAATCTG
MVH-13 GCCGGCCATGGCCGAVGTGAAGYTGGTGAGTCTG
MVH-14 GCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGSKGGTGAGTCTGGG
MVH-15 GCCGGCCATGGCCGAKGTGCAMCTGGTGAGTCTGGG
MVH-16 GCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGCTGATGGARTCTGG
MVH-17 GCCGGCCATGGCCGAGGTGCARCTTGTGAGTCTGGTG
MVH-18 GCCGGCCATGGCCGARGTRAAGCTTCTAGAGTCTGGA
MVH-19 GCCGGCCATGGCCGAAGTGAARSTTGAGGAGTCTGG
MVH-20 GCCGGCCATGGCCGAAGTGATGCTGGTGAGTCTGGG
MVH-21 GCCGGCCATGGCCGAGTTACTCTRAAGWGTSTGGCC
MVH-22 GCCGGCCATGGCCGAGTCCAATVCAGCARCCTGG
MVH-23 GCCGGCCATGGCCGAGTYCARCTGCAGCAGTCTG
MVH-24 GCCGGCCATGGCCGATGTGAAGTTGAAGTGTCTGG
MVH-25 GCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGTCATCGAGTCTGG

45 [0274] Cebadores delanteros de cadena H:

50
MJH-REV1&2 GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGACGGTGACCGTGG
MJH-REV2INT GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGACGGTGACAGTGG
MJH-REV3 GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGACGGTGACCAAG
MJH-REV4 GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGACGGTGACCGAGG

55 Tecla de posición variable: R (A/G); MAC); Y (T/C); W (A/T); S (G/C); K (G/T); H (A/T/C); B (G/C/T); V (G/A/C); D (G/A/T); N (G/A/T/C)

60 [0275] En este experimento, se utilizan oligos específicos de ratón. Para obtener resultados más reproducibles, también se pueden usar oligos específicos de rata.

Resultados

65 [0276] La secuencia de la cadena ligera del anticuerpo NR2F10 específico para LGR5 (véase la Tabla 4) y las secuencias de cadena pesada de anticuerpos 6d8 y 2f4 específicos para LGR6 (véase la Tabla 5) se representan en la Figura 27. Las regiones CDR se indican en **negrita** Y en *cursiva*. Las secuencias CDR se determinaron de acuerdo con Kabat (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. of Health and Human

Services, National Institute of Health, 1987). Los anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que comprenden al menos una de estas secuencias CDR constituyen un compuesto de unión de alta afinidad con una alta especificidad para sus proteínas diana LGR5 y/o LGR6.

5 **Referencias 1**

[0277]

- 1) Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111 (2001)
- 2) Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li H, Eaves CJ Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*.439:993-7
- 3)BachSP,RenehanAG,PottenCS..Stemcells:theintestinalstemcellasaparadigm.*Carcinogenesis*21(3):469-76 (2000)
- 4) Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J. Clin. Invest* 105(11):1493-9 (2000) 5) Bjerknes M, Cheng H.. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116(1):7-14 (1999)
- 6) Nishimura S, Wakabayashi N, Toyoda K, Kashima K, Mitsufuji S.. Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig. Dis. Sci.* 48(8):1523-9 (2003)
- 7) Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 71(1):28-41 (2003)
- 8) He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet.* 36:1117-21 (2004)
- 9) Bjerknes M, Cheng H. Re-examination of P-PTEN staining patterns in the intestinal crypt. *Nat Genet.* 37: 1016-7 (2005)
- 10) Marshman E, Booth C, Potten CS.. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24(1):91-8 (2002)
- 11) Yatabe Y, Tavare S, Shibata D.. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(19):10839-44 (2001)
- 12) Radtke, F and Clevers, H., Self-renewal and cancer of the gut: Two sides of a coin. *Review Science.* 307: 1904-1909 (2005)
- 13) Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111 (2001)
- 14) Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer Stem Cells--Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 66:9339-44 (2006).
- 15) Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*.367:645-8 (1994)
- 16) Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 3:730-7 (1997).
- 17) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3983-8 (2003).
- 18) Nakano I, Kornblum HI Brain tumor stem cells. *Pediatr Res.* 59:54R-8R. Review (2006)
- 19) Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer.* 42:1213-8. Review (2006)
- 20) O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106-10 (2007).
- 21) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 445:111-5 (2007)
- 22) van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A-P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., Clevers, H. The beta-catenin/TCF4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111: 241-250 (2002)
- 23) Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., Pals, S.T. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 54: 515-523 (1999)
- 24) Malaterre, J. et al. c-Myb is required for progenitor cell homeostasis in colonic crypts. *Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU.* 104, 3829-3834 (2007)
- 25) Brigelius-Flohe, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors (2006) *Biological Chemistry*, 387 (10-11), pp. 1329-1335.
- 26) Neid, M., Wittekind, C. Epidemiology, pathology, and staging of mesenchymal and endocrine tumours of the gastrointestinal tract (2007) *Chirurgische Gastroenterologie nterdisziplinär*, 23 (2), pp. 108-112.
- 27) Battle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., van den Born, M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., Clevers, H. Beta- catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111: 251-263 (2002)

- 28) Haramis, A.P., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J., Clevers, H. De novo crypt formation and Juvenile Polyposis upon BMP inhibition Science. 303: 1684-1686 (2004)
- 29) Hewitt, K.J., Agarwal, R., Morin, P.J. The claudin gene family: Expression in normal and neoplastic tissues (2006) BMC Cancer, 6, art. no. 186
- 5 30) Shea Yu Hsu, Kudo, M., Chen, T., Nakabayashi, K., Bhalla, A., Van der Spek, P.J., Van Duin, M., (...), Hsueh, A.J.W. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): Identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7 (2000) Molecular Endocrinology, 14 (8), pp. 1257-1271.
- 31) Van Schoore, G., Mendive, F., Pochet, R., Vassart, G. Expression pattern of the orphan receptor LGR4/GPR48 gene in the mouse (2005) Histochemistry and Cell Biology, 124 (1), pp. 35-50
- 10 32) Mazerbourg, S., Bouley, D.M., Sudo, S., Klein, C.A., Zhang, J.V., Kawamura, K., Goodrich, L.V., (...), Hsueh, A.J.W. Leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor 4 null mice exhibit intrauterine growth retardation associated with embryonic and perinatal lethality. (2004) Molecular Endocrinology, 18 (9), pp. 2241-2254
- 33) Mendive, F., Laurent, P., Van Schoore, G., Skarnes, W., Pochet, R., Vassart, G. Defective postnatal development of the male reproductive tract in LGR4 knockout mice. 2006) Developmental Biology, 290 (2), pp. 421-434.
- 15 34) Kato, S., Matsubara, M., Matsuo, T., Mohri, Y., Kazama, I., Hatano, R., Umezawa, A., (...), Nishimori, K. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-4 (LGR4, Gpr48) is essential for renal development in mice (2006) Nephron - Experimental Nephrology, 104 (2), pp. e63-e75
- 20 35) Morita H, Mazerbourg S, Bouley DM, Luo CW, Kawamura K, Kuwabara Y, Baribault H, Tian H, Hsueh AJ. Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. Mol Cell Biol. 24:9736-43 (2004)
- 36) Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, Hirohashi S. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. Hepatology. 37:528-33 (2003)
- 25 37) McClanahan T, Koseoglu S, Smith K, Grein J, Gustafson E, Black S, Kirschmeier P, Samatar AA. Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. Cancer Biol Ther. 5:419-26. (2006).

Referencias 2

[0278]

1. Gregorieff, A. & Clevers, H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. Genes Dev 19, 877-90 (2005).
- 35 2. Bjerknes, M. & Cheng, H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. Gastroenterology 116, 7-14 (1999).
3. Winton, D. J. & Ponder, B. A. Stem-cell organization in mouse small intestine. Proc Biol Sci 241, 13-8 (1990).
4. Potten, C. S., Booth, C. & Pritchard, D. M. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. Int J Exp Pathol 78, 219-43 (1997).
- 40 5. Korinek, V. et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. Nat Genet 19, 379-83 (1998).
6. van de Wetering, M. et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. Cell 111, 241-50 (2002).
- 45 7. Van der Flier, L. G. et al. The Intestinal Wnt/TCF Signature. Gastroenterology 132, 628-32 (2007).
8. Hsu, S. Y., Liang, S. G. & Hsueh, A. J. Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region. Mol Endocrinol 12, 1830-45 (1998).
9. McClanahan, T. et al. Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. Cancer Biol Ther 5, 419-26 (2006).
- 50 10. Yamamoto, Y. et al. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. Hepatology 37, 528-33 (2003).
11. Morita, H. et al. Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. Mol Cell Biol 24, 9736-43 (2004).
- 55 12. Rey, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature 434, 843-50 (2005).
13. Cheng, H. & Leblond, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. Am J Anat 141, 537-61 (1974).
14. Bjerknes, M. & Cheng, H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells in the adult mouse. Am J Anat 160, 77-91 (1981).
- 60 15. Stappenbeck, T. S., Mills, J. C. & Gordon, J. I. Molecular features of adult mouse small intestinal epithelial progenitors. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100, 1004-9 (2003).
16. Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet 21, 70-1 (1999).
17. Potten, C. S., Owen, G. & Booth, D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. J Cell Sci 115, 2381-8 (2002).
- 65 18. Ohlstein, B., Kai, T., Decotto, E. & Spradling, A. The stem cell niche: theme and variations. Curr Opin Cell Biol 16, 693-9 (2004).

19. Clayton, E. et al. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 446, 185-9 (2007).
20. Nishimura, S., Wakabayashi, N., Toyoda, K., Kashima, K. & Mitsufuji, S. Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci* 48, 1523-9 (2003).
21. Potten, C. S. et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; Musashi-1. *Differentiation* 71, 28-41 (2003).
22. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-10 (2007).
23. He, X. C. et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36, 1117-21 (2004).
24. Claudinot, S., Nicolas, M., Oshima, H., Rochat, A. & Barrandon, Y. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 102, 14677-82 (2005).
25. Cotsarelis, G., Sun, T. T. & Lavker, R. M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61, 1329-37 (1990).
26. Tumber, T. et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303, 359-63 (2004).
27. Morris, R. J. et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 411-7 (2004).
28. Bjerknes, M. & Cheng, H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G767-77 (2002).
29. Sleeman, K. E. et al. Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol* 176, 19-26 (2007).
30. Muncan, V. et al. Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol* 26, 8418-26 (2006).

Referencias 5

[0279]

1. Barker, N. v. d. W., M. Clevers, H. The intestinal stem cell. *Gen Dev* in press, (2008).
2. Potten, C. S. Kinetics and possible regulation of crypt cell populations under normal and stress conditions. *Bull Cancer* 62, 419-30 (1975).
3. Barker, N. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-7 (2007).
4. Cheng, H. & Leblond, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 141, 537-61 (1974).
5. Cheng, H. & Leblond, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* 141, 461-79 (1974).
6. Marshman, E., Booth, C. & Potten, C. S. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91-8 (2002).
7. Bjerknes, M. & Cheng, H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from paneth cells in the newborn mouse. *Am J Anat* 160, 65-75 (1981).
8. Bjerknes, M. & Cheng, H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat* 160, 51-63 (1981).
9. Ireland, H., Houghton, C., Howard, L. & Winton, D. J. Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev Dyn* 233, 1332-6 (2005).
10. Jones, S. et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 105, 4283-8 (2008).
11. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-70 (1996).
12. Korinek, V. et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275, 1784-7 (1997).
13. Morin, P. J. et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-90 (1997).
14. van de Wetering, M. et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-50 (2002).
15. Van der Flier, L. G. et al. The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* 132, 628-32 (2007).
16. Sansom, O. J. et al. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18, 1385-90 (2004).
17. Shibata, H. et al. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* 278, 120-3 (1997).
18. Sansom, O. J. et al. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 446, 676-9 (2007).
19. Sansom, O. J. et al. Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine. *J Biol Chem* 280, 28463-7 (2005).
20. Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-1 (1999).

Reivindicaciones

1. Un método para obtener células madre Lgr5+ que comprende
 - 5 - poner en contacto una suspensión de células aisladas de una muestra de tejido u órgano normal o de una muestra de tumor sólido o líquido con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5; y
 - identificar las células unidas a dicho compuesto aglutinante.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de aislar las células madre.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las células madre son intestinales, de retina, de cerebro, de mama, de folículo piloso, de estómago, de hígado, de pulmón, de páncreas, de testículos, de corazón o de células madre ováricas.
- 15 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células madre son células madre de cáncer.
5. El método según la reivindicación 4, en el que las células madre del cáncer están implicadas en cáncer intestinal, incluyendo colon, cáncer colorrectal, cáncer de piel, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de próstata, meduloblastoma y otros cánceres cerebrales, cáncer de hígado, Cáncer de retina, cáncer de cabeza y cuello, cáncer testicular, cáncer de folículo piloso, cáncer de ovario o cáncer de pulmón.
- 20 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se utiliza la Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia o la clasificación de gránulos magnéticos para identificar y ordenar las células que se unen al anticuerpo, derivado o fragmento de Lgr5.
- 25 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos dos compuestos de unión diferentes se ponen en contacto con la suspensión celular.
- 30 8. El método según la reivindicación 7, en el que uno de los compuestos de unión es un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y uno de los compuestos de unión es un anticuerpo, un derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr6.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la etapa de aislar las células madre de dicho anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 y/o Lgr6.
- 40 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además la etapa de mantener o cultivar las células madre de tejido u órgano proporcionando las células madre de tejido u órgano con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5 .
- 45 11. Células madre Lgr5+ aisladas obtenibles mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6 a 10, en la que la célula madre es un intestino, cerebro, hígado, retina, estómago, páncreas, ovario, médula suprarrenal, vejiga, hueso, tejido conectivo, oído, músculo, próstata, placenta, útero o células madre de mama.
- 50 12. Una colección aislada de células madre que comprende más de 50% de células madre Lgr5 positivas, donde la célula madre es un intestino, cerebro, hígado, retina, estómago, páncreas, ovario, médula suprarrenal, vejiga, hueso, tejido conectivo, oído, músculo, próstata, placenta, útero o células madre de mama.
- 55 13. Una célula madre aislada que comprende Lgr5 en su membrana celular, en la que la célula madre es un intestino, cerebro, hígado, retina, estómago, páncreas, ovario, médula suprarrenal, vejiga, hueso, tejido conectivo, oído, músculo, próstata, placenta, útero o células madre del seno.
- 60 14. La célula madre o colección de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que es una célula madre del intestino delgado o colon o que es una célula madre rectal.
- 65 15. Una célula madre aislada o una colección de células madre, en la que la célula madre contiene un compuesto de unión a Lgr5 específico, en el que dicho compuesto de unión a Lgr5 es un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5.
16. Células madre aisladas de Lgr5+ cancerígenas obtenibles por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10.

17. Células madre de cáncer aisladas que comprenden Lgr5 incorporada en su membrana celular.
18. Una colección de células madre cancerosas capaces de incluir Lgr5 en su membrana celular, donde dicha colección comprende al menos el 50% de células madre cancerosas capaces de recapitular la generación de un tumor en crecimiento continuo.
19. Células madre aisladas según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 13 a 15 o la recogida de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 14 a 15, para uso en un método de tratamiento.
20. El uso de las células madre aisladas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 13 a 15 o la recogida de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14 a 15 en la preparación de un medicamento para tratar tejido dañado o enfermo.
21. Una composición para uso en el tratamiento del daño de tejidos o órganos que comprende las células madre aisladas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 13 a 15 o la recogida de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14 a 15, preferiblemente células madre de tejido u órgano.
22. Un anticuerpo, derivado o fragmento del mismo que tiene afinidad por Lgr5, o un inhibidor de una transcripción de ARNm de Lgr5, para uso en el diagnóstico in vivo de la presencia y/o contenido de células madre de cáncer en un tumor.
23. El anticuerpo, derivado o fragmento del mismo que tiene afinidad por Lgr5 para uso según la reivindicación 22, en el que el anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene afinidad por Lgr5 se conjuga con una sustancia que permite la formación de imágenes radiactivas, la resonancia magnética, o la radiografía/tomografía computarizada.
24. Un método para determinar si una muestra comprende una célula madre de cáncer, que comprende:
 - poner en contacto una suspensión de células aisladas de un tejido normal, una muestra de órgano o una muestra de tumor sólido o líquido con un compuesto de unión, donde el compuesto de unión es un anticuerpo, derivado o fragmento del mismo que tiene afinidad por Lgr5;
 - eliminación del compuesto de unión no unido;
 - detectar cualquier complejo ligado; y
 - determinar la presencia de una célula madre cancerosa de la presencia de complejo ligado.
25. El uso de un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene afinidad por Lgr5 para identificar células madre en o para aislar células madre de una muestra de tejido u órgano.
26. El uso según la reivindicación 25, en el que las células madre son células madre de cáncer.
27. El uso de Lgr5 como marcador para el aislamiento de tejidos u órganos de células madre de una muestra de tejido u órgano.
28. Un método para mantener o cultivar las células madre de órganos o tejidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 13 a 17 o la recogida de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14 a 15 o 18, que comprende la proporción al tejido o células madre de órganos con un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5.
29. Uso de las células madre de cáncer aisladas según la reivindicación 16 o la reivindicación 17 o la recogida de células madre de cáncer según la reivindicación 18 en la identificación de compuestos que pueden usarse en el tratamiento del cáncer.
30. Un método para comprobar el efecto de un posible compuesto de células madre anticáncer que comprende la puesta en contacto de las células madre de cáncer aisladas de acuerdo con la reivindicación 16 o la reivindicación 17 o la recogida de células madre cancerosas según la reivindicación 18 *in vitro* con dicho posible compuesto de células madre anticancerígenas y comprobar si dichas células madre cancerosas tratadas son capaces de generar un tumor de crecimiento continuo.
31. Un método *in vitro* para determinar la efectividad de un tratamiento anticanceroso, que comprende la determinación de la presencia de células madre cancerosas poniendo en contacto células de cáncer con un compuesto de unión a Lgr5 *in vitro* antes y después del tratamiento anticáncer, en el que dicho compuesto de unión a Lgr5 es un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a Lgr5.

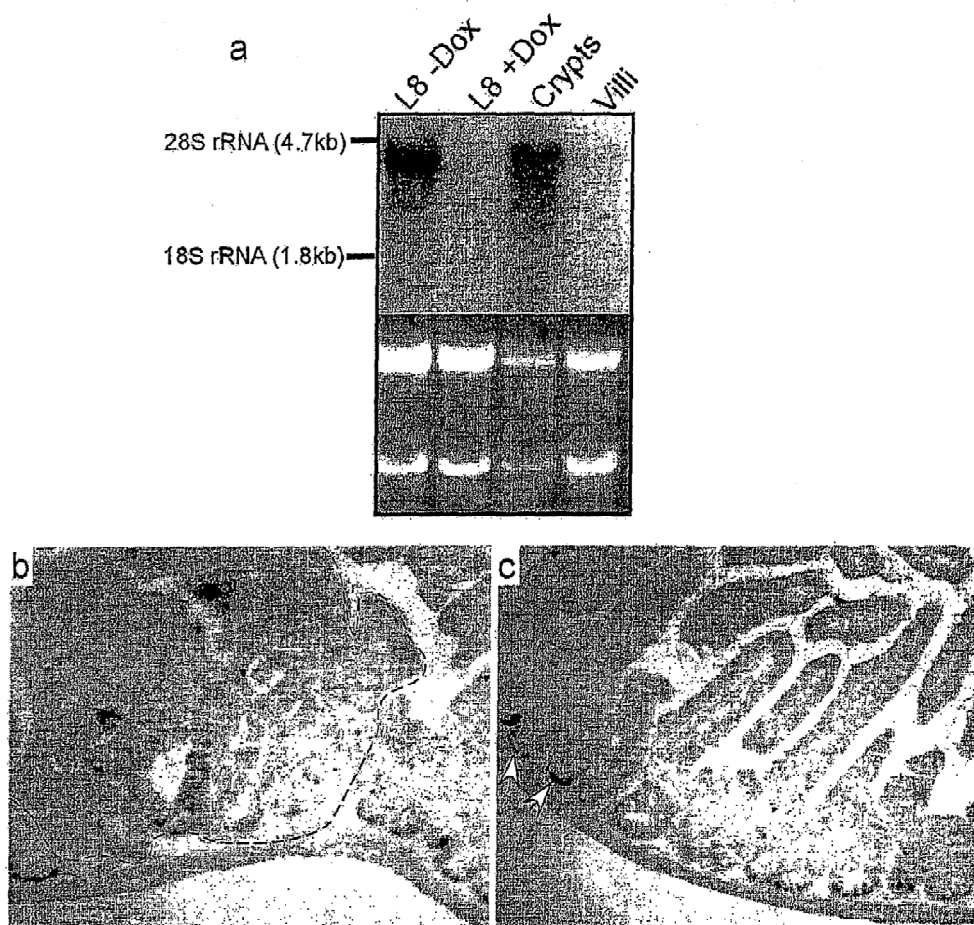


Fig. 1

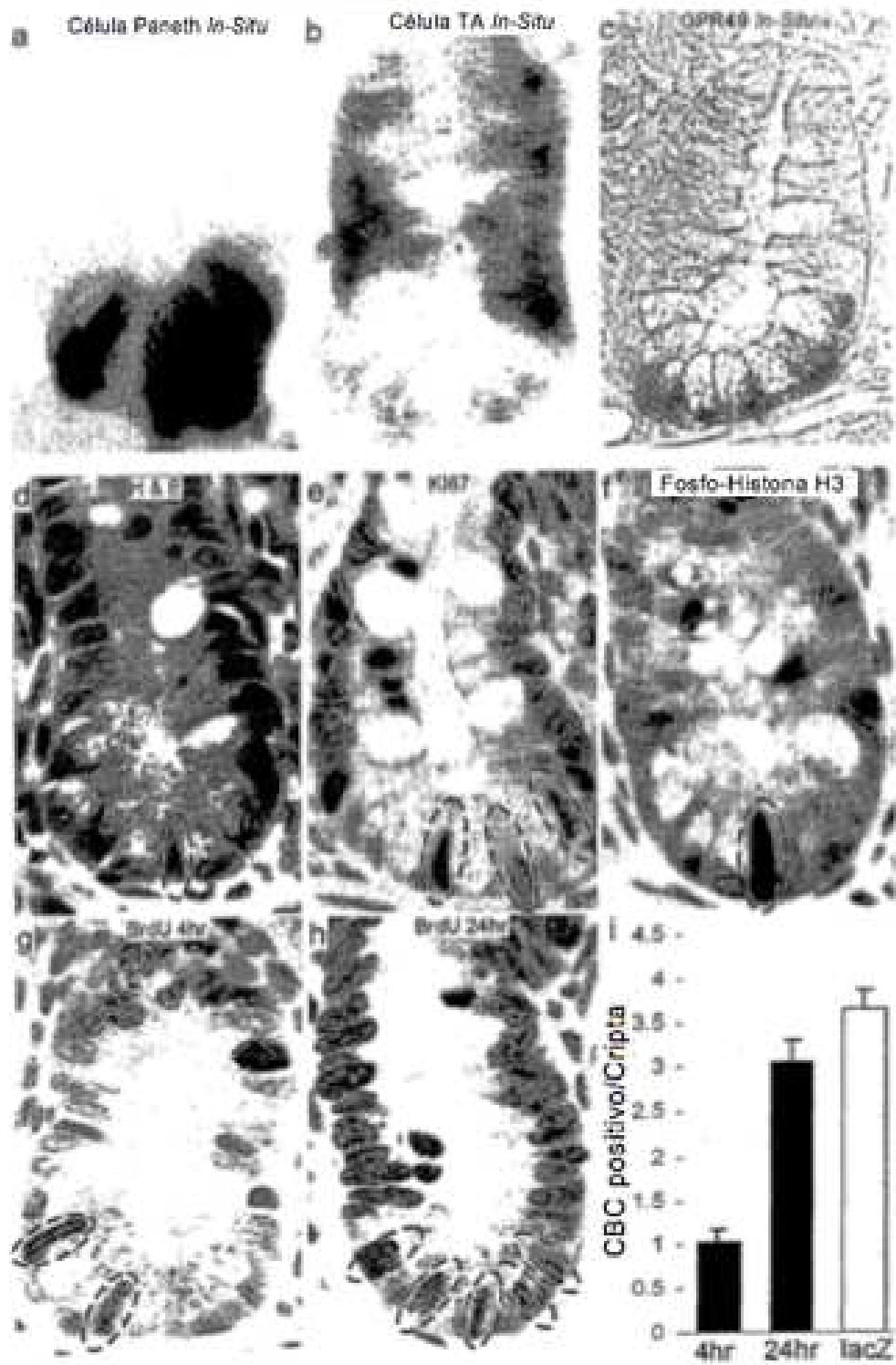


Fig. 2

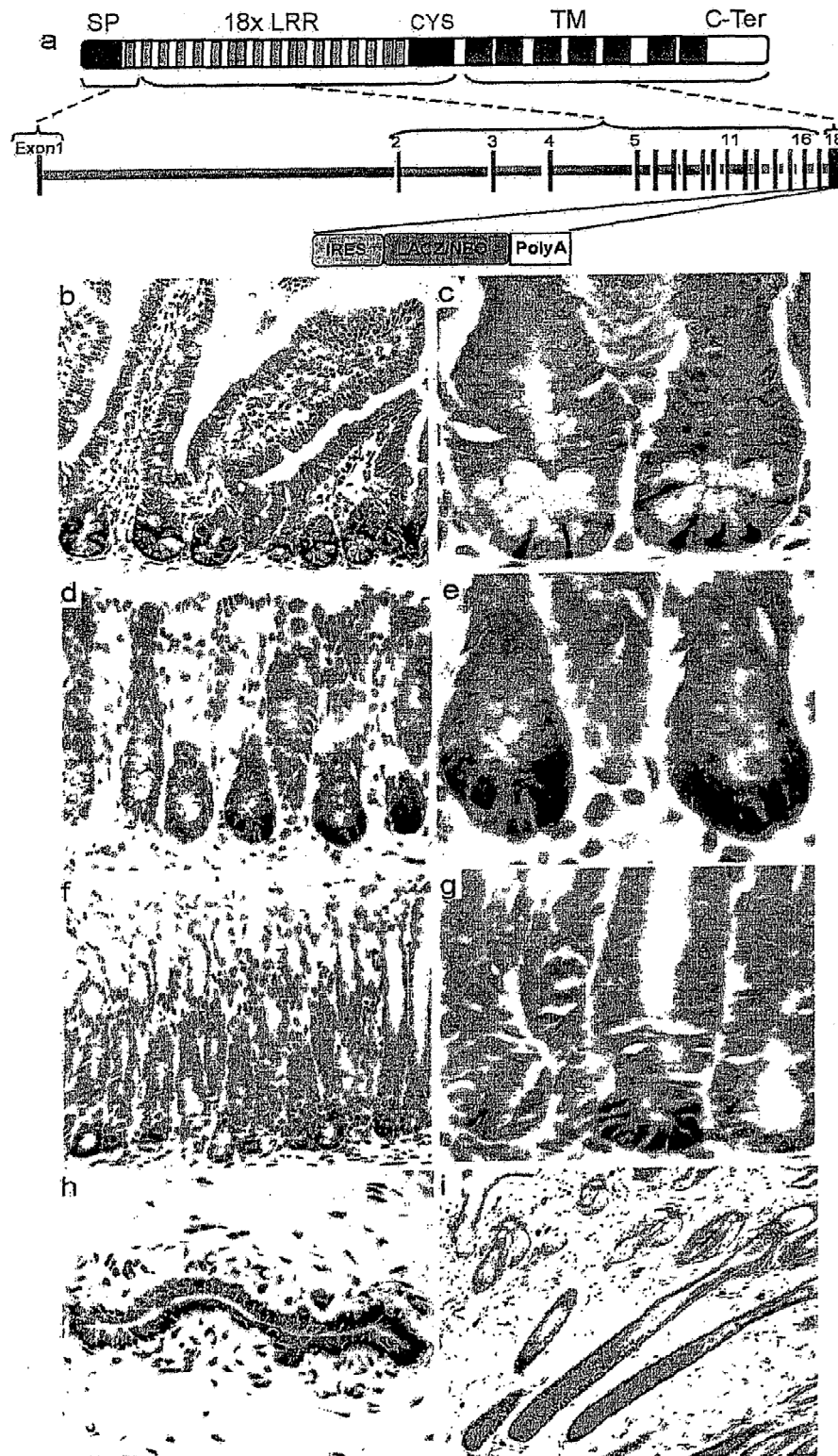


Fig. 3

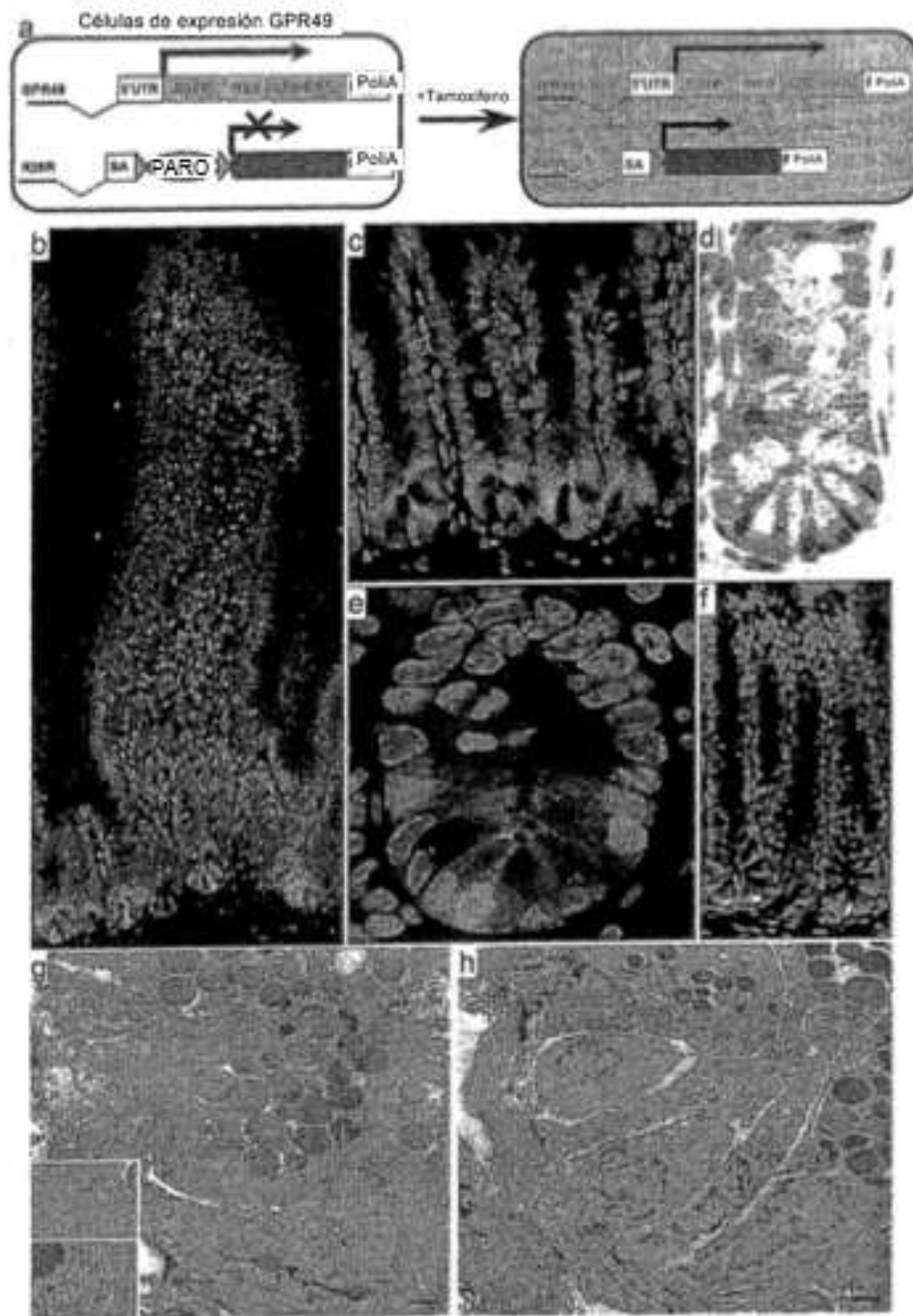


Fig.4

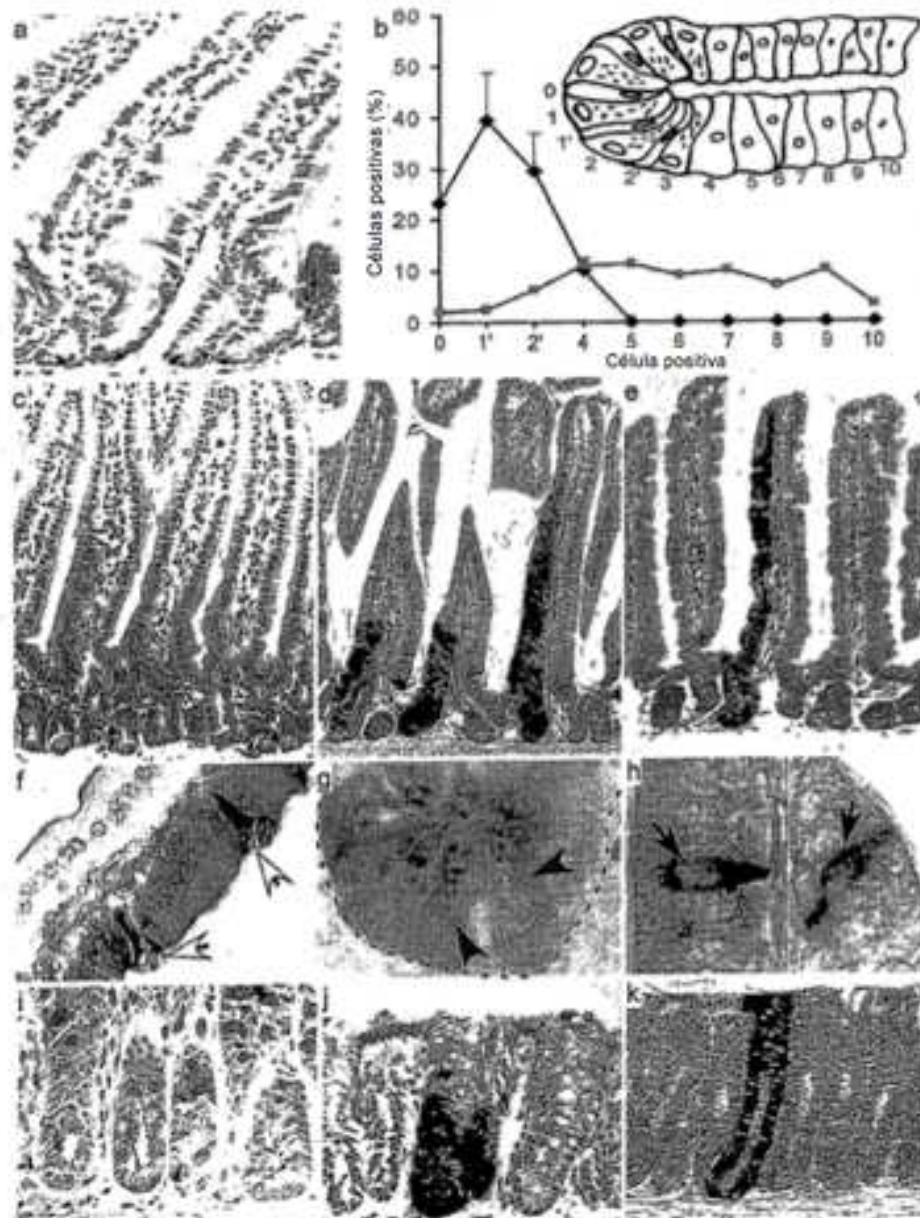


Fig.5

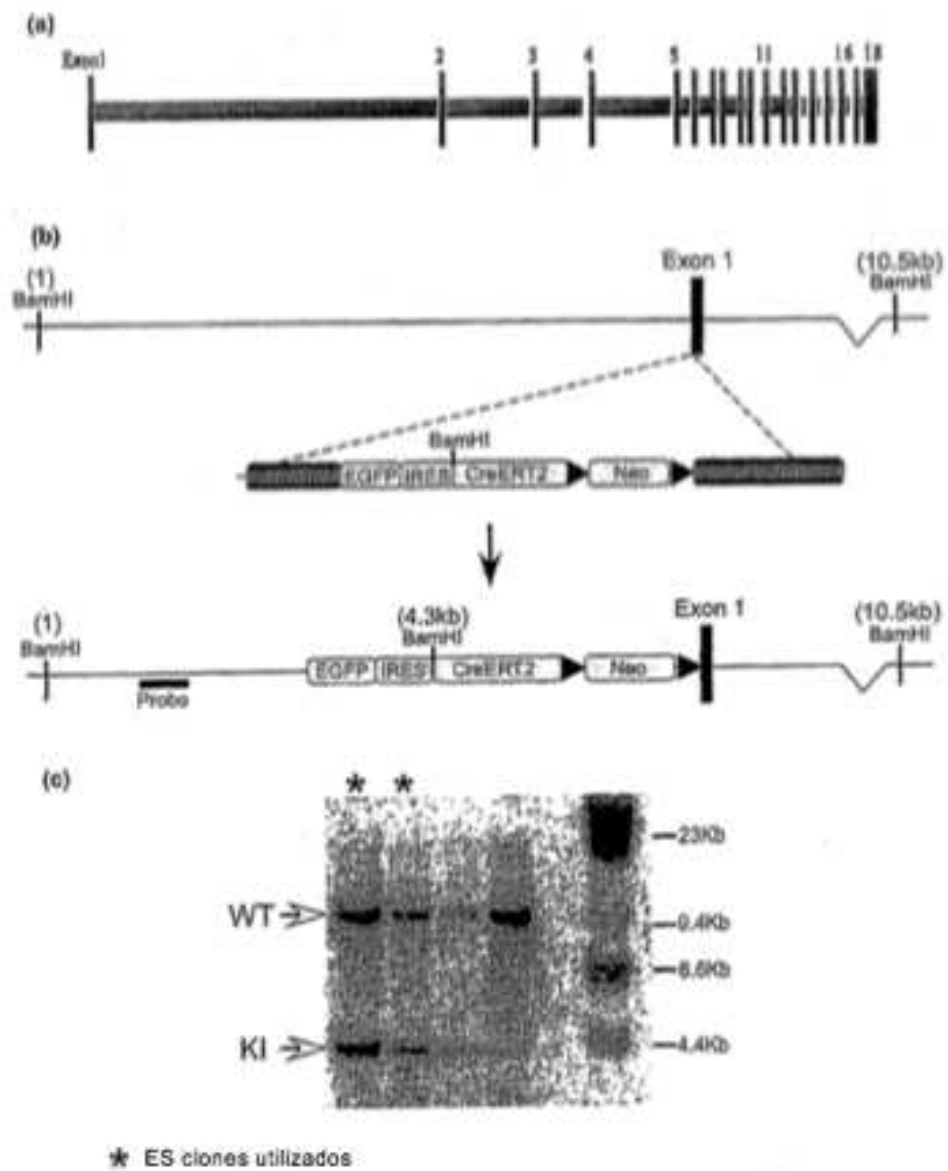


Fig.6

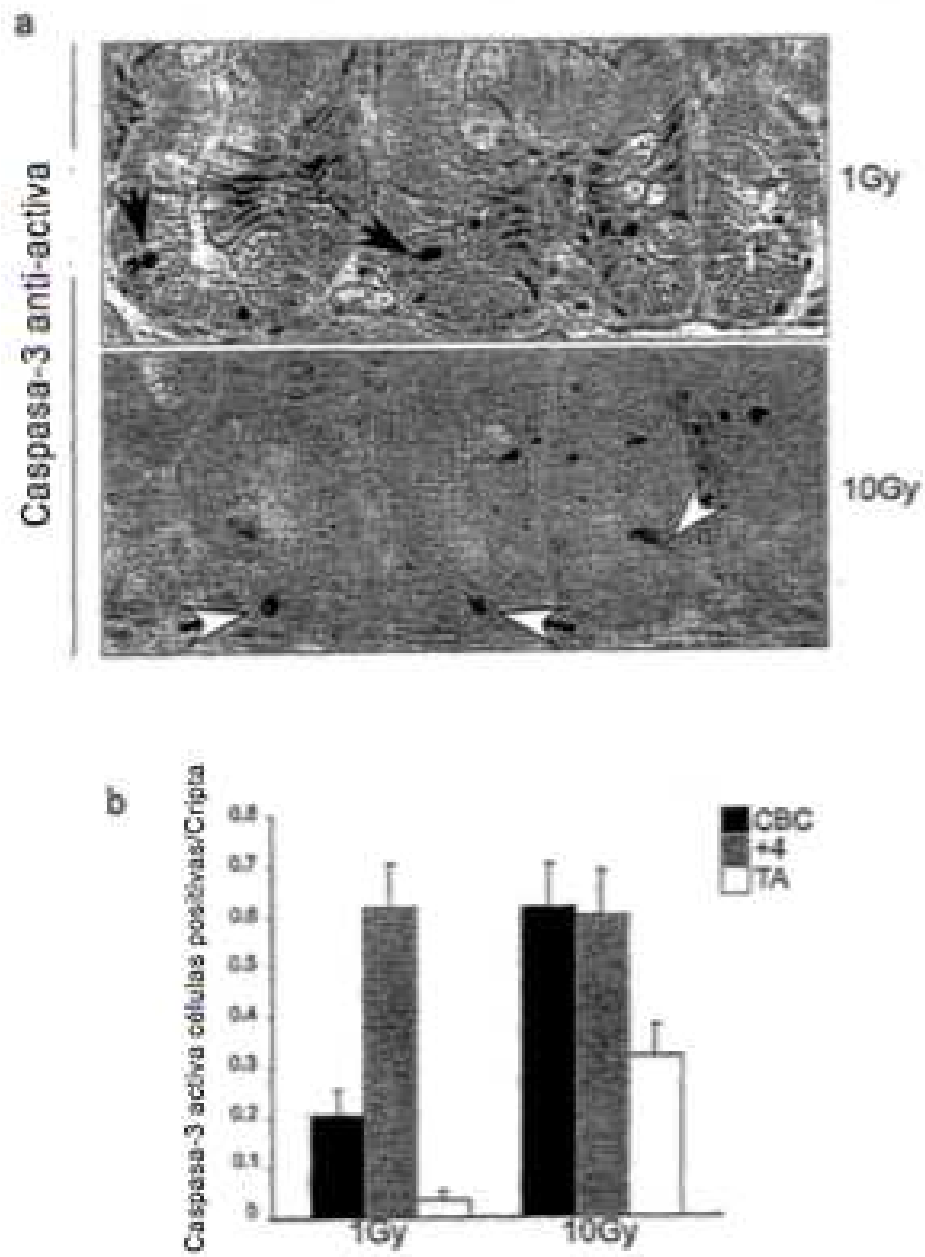


Fig.7

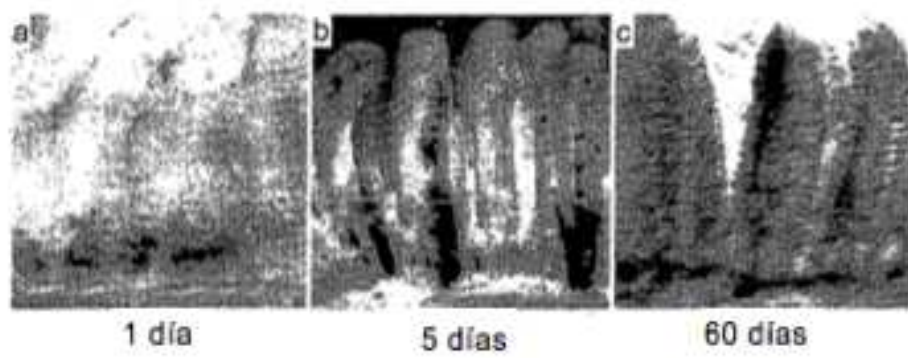


Fig.8

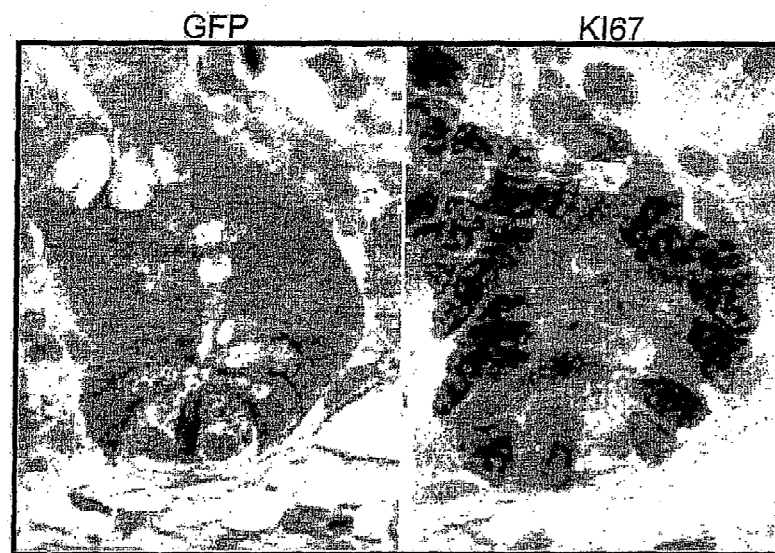


Fig.9

hs-1gr-4-1	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
nn-1gr-4-2	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
nn-1gr-4	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
hs-1gr-5-1	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
nn-1gr-5	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
nn-1gr-5	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
hs-1gr-6-1	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
nn-1gr-6	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
nn-1gr-6	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Consenso	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
hs-1gr-4-1	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
nn-1gr-4-2	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
nn-1gr-4	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
hs-1gr-5-1	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
nn-1gr-5	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
nn-1gr-5	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
hs-1gr-6-1	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
nn-1gr-6	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
nn-1gr-6	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Consenso	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
hs-1gr-4-1	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
nn-1gr-4-2	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
nn-1gr-4	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
hs-1gr-5-1	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
nn-1gr-5	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
nn-1gr-5	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
hs-1gr-6-1	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
nn-1gr-6	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
nn-1gr-6	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Consenso	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
hs-1gr-4-1	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
nn-1gr-4-2	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
nn-1gr-4	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
hs-1gr-5-1	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
nn-1gr-5	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
nn-1gr-5	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
hs-1gr-6-1	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
nn-1gr-6	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
nn-1gr-6	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Consenso	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520

Fig.10

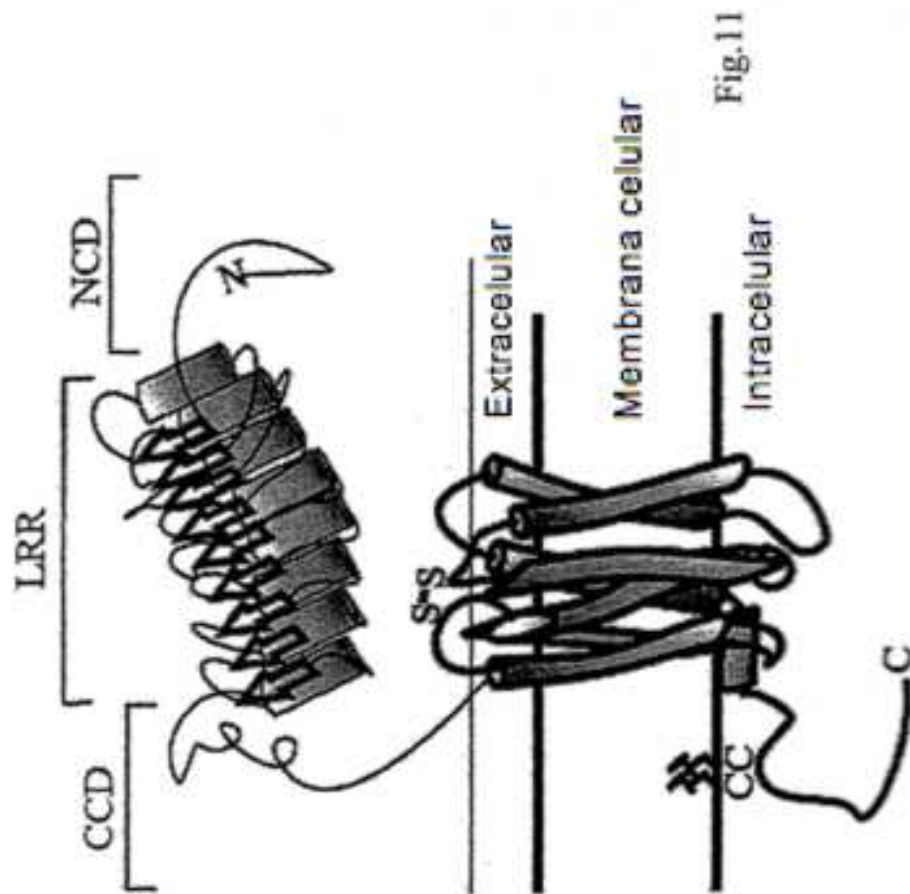


Fig.11

Figura 12

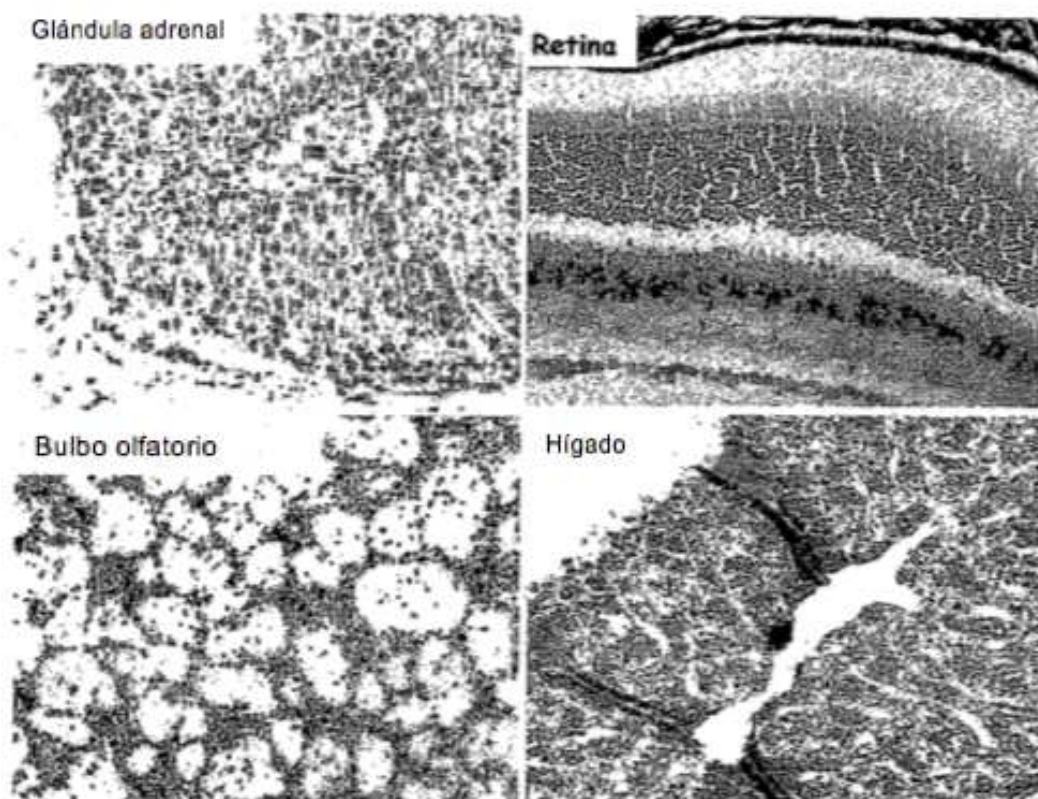


Figura 13

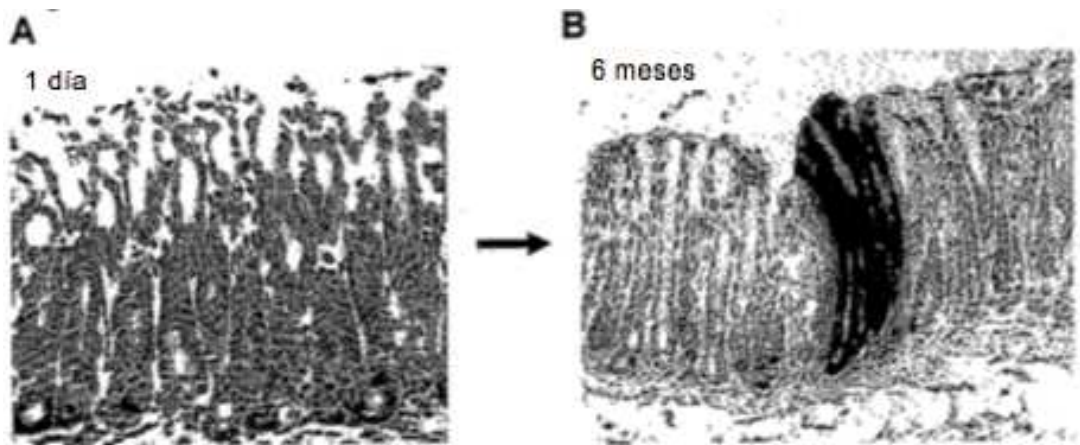


Figura 14

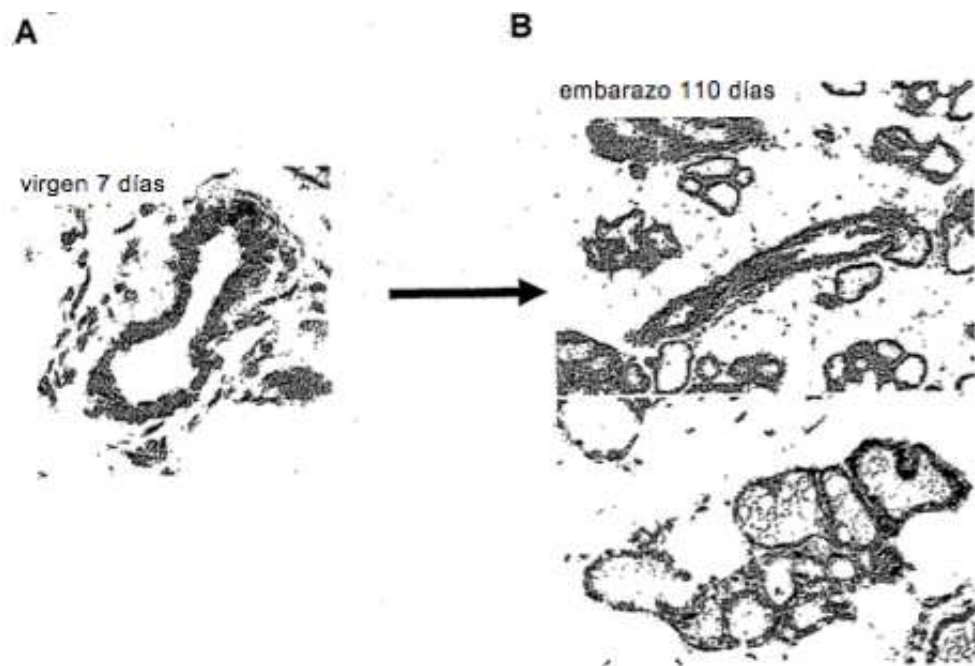


Figura 15

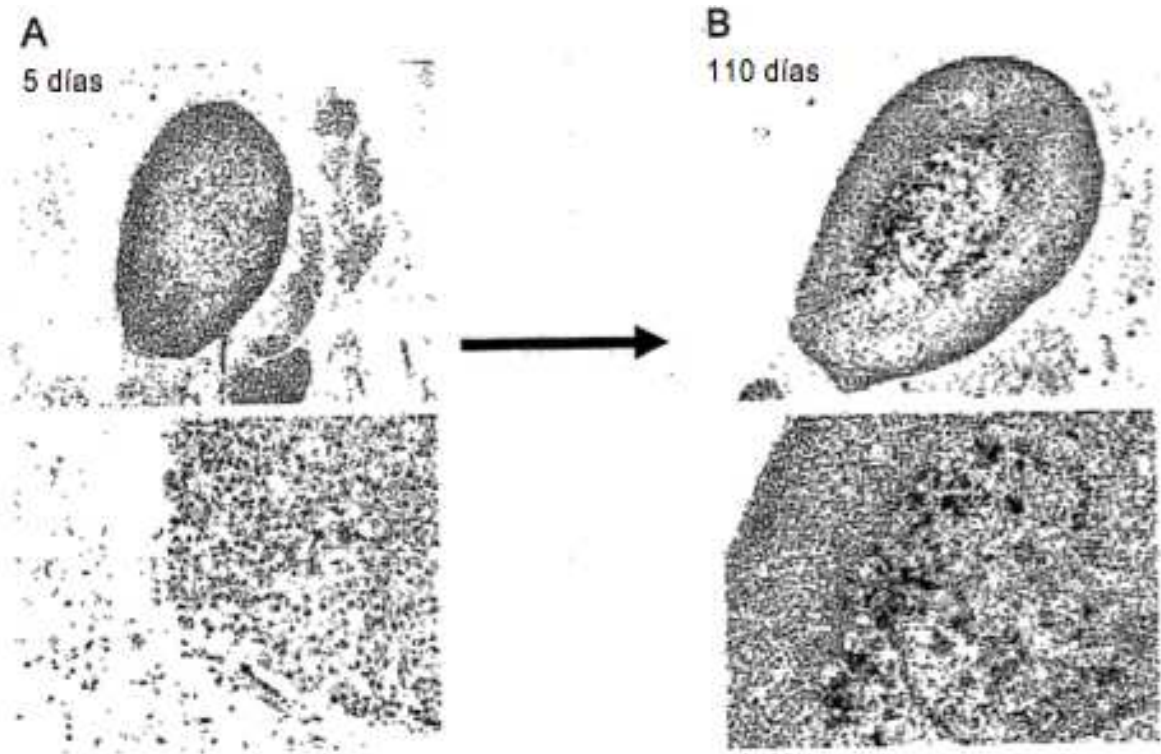


Figura 16

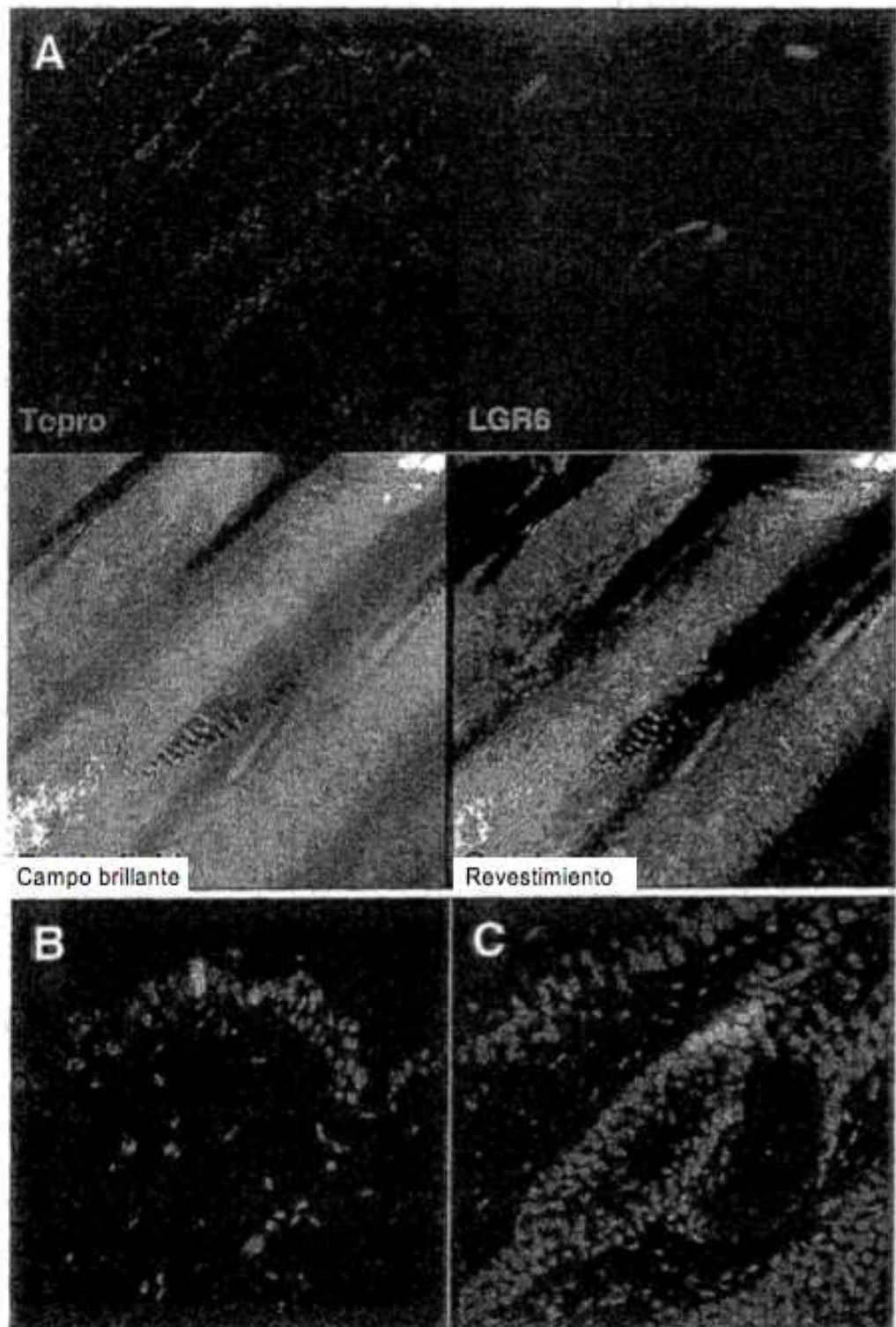


Figura 17

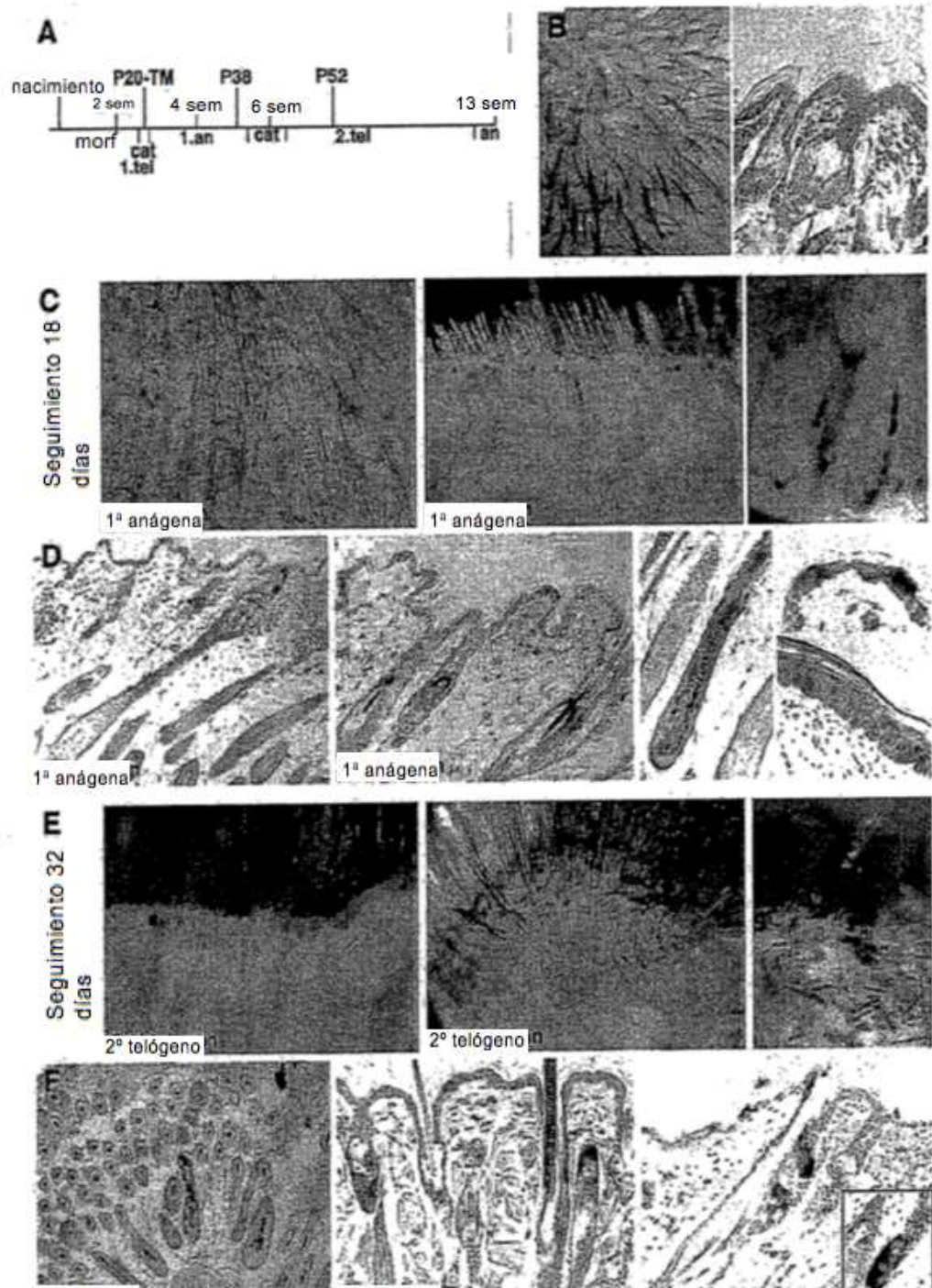


Figura 18

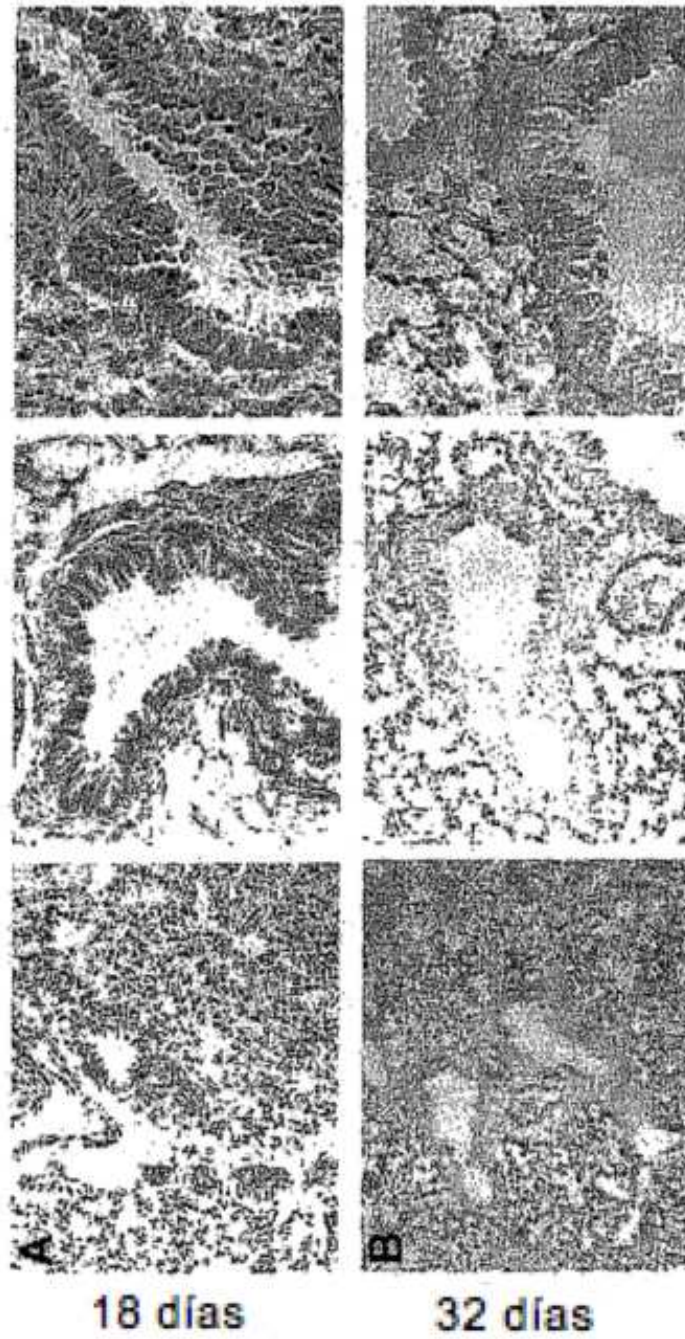


Figura 19

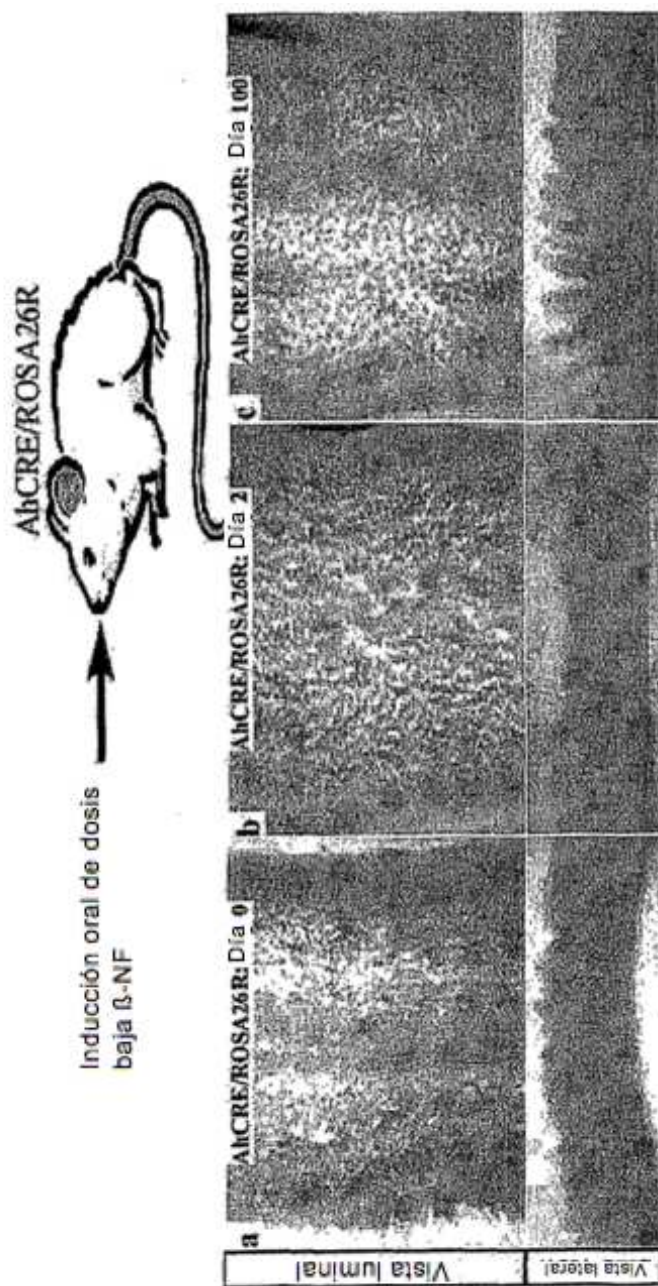


Figura 20

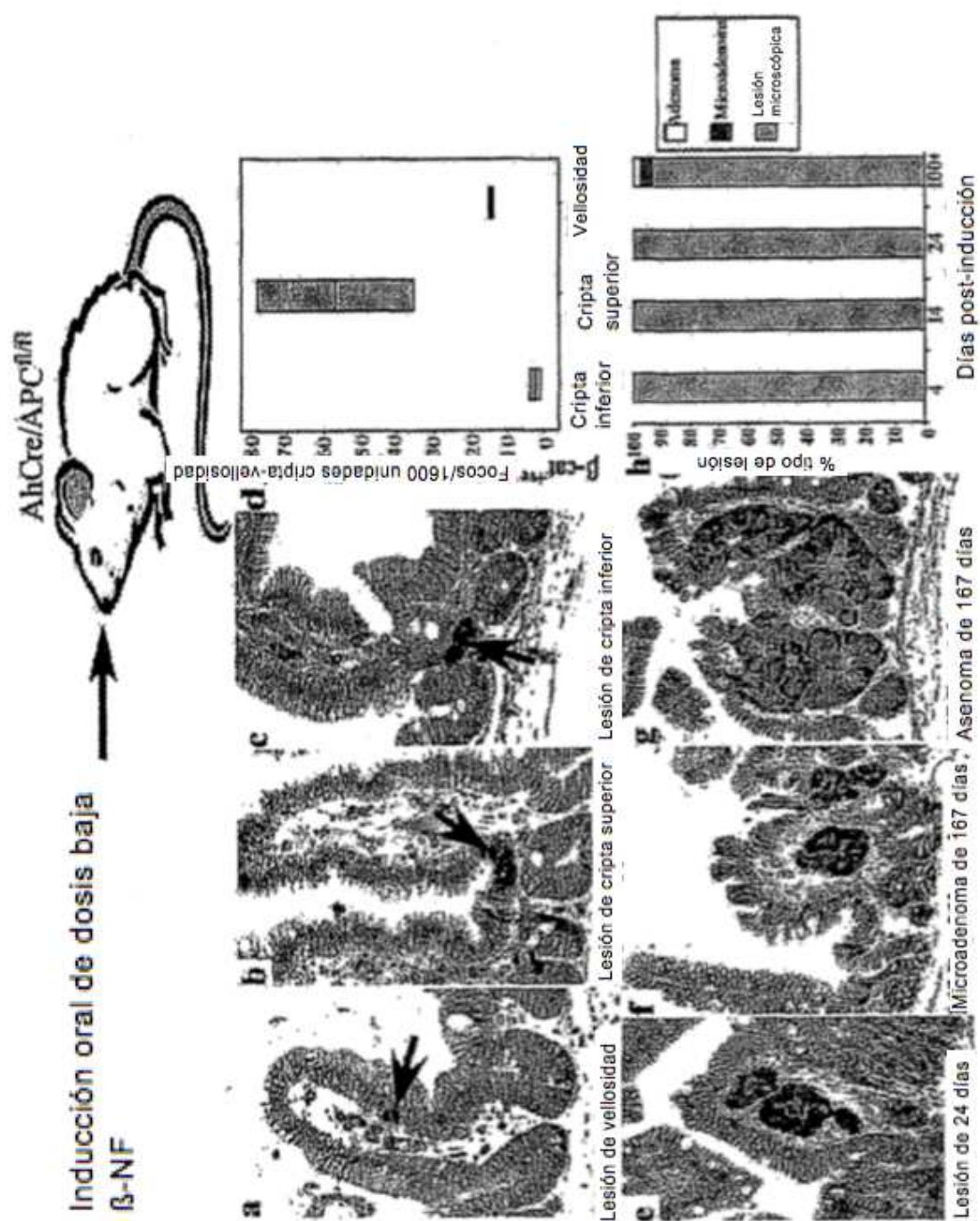


Figura 21

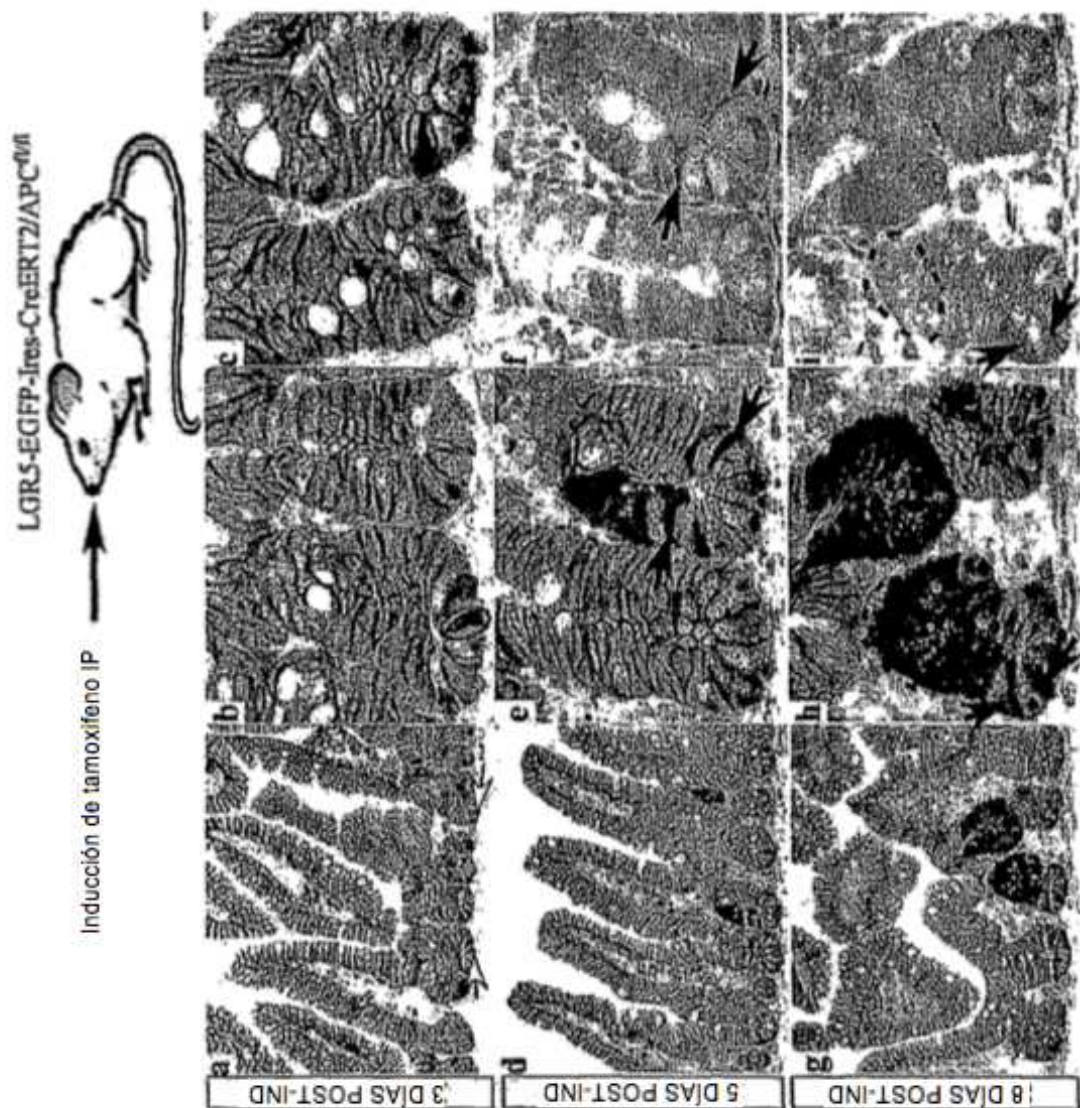


Figura 22

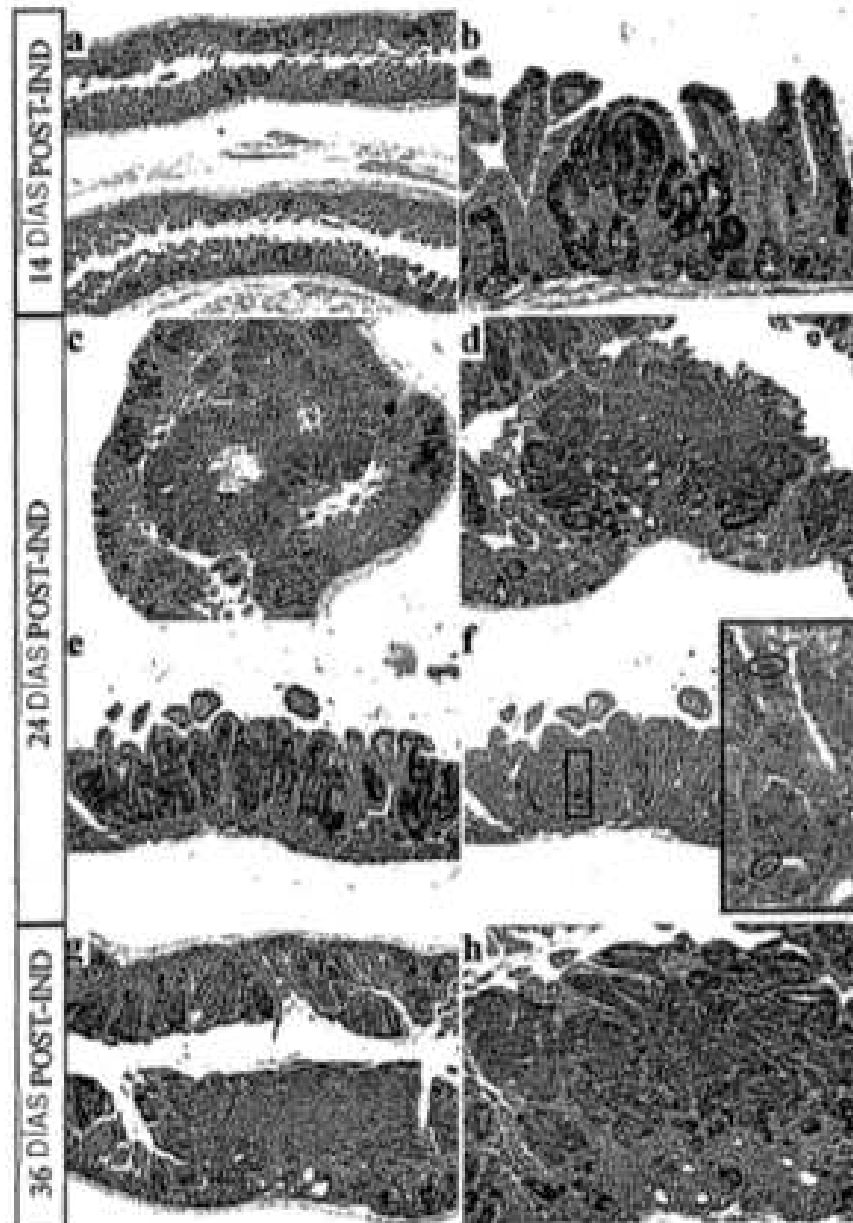


Figura 23

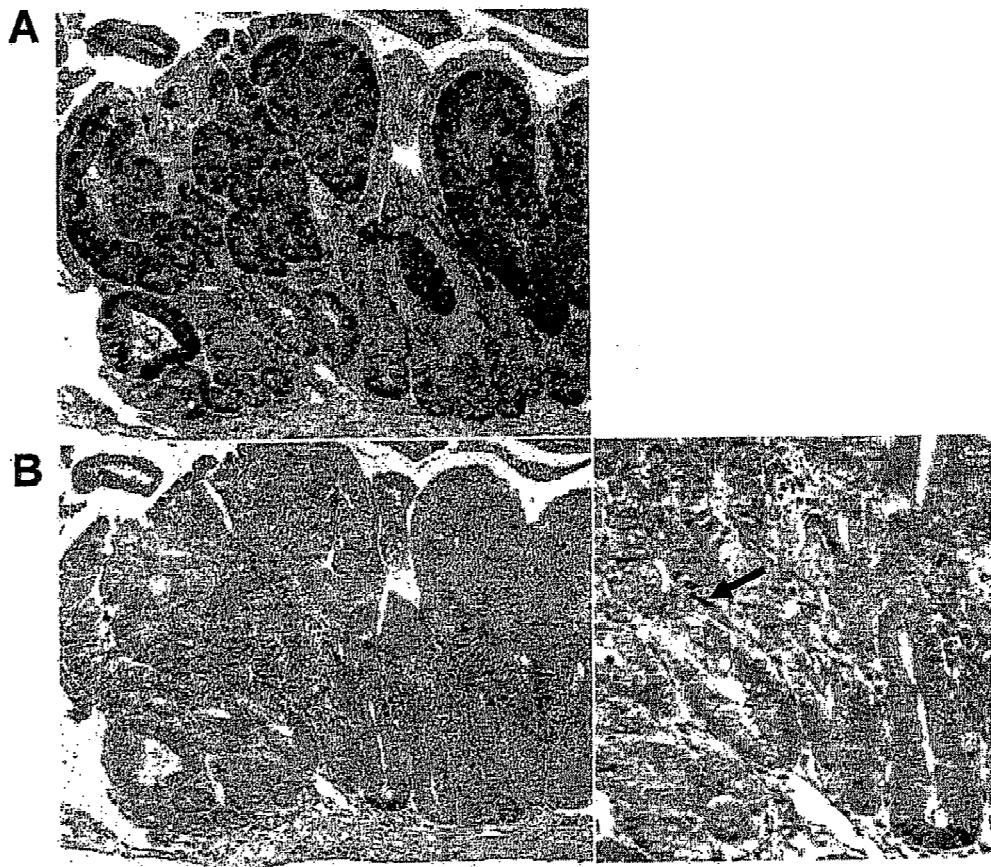
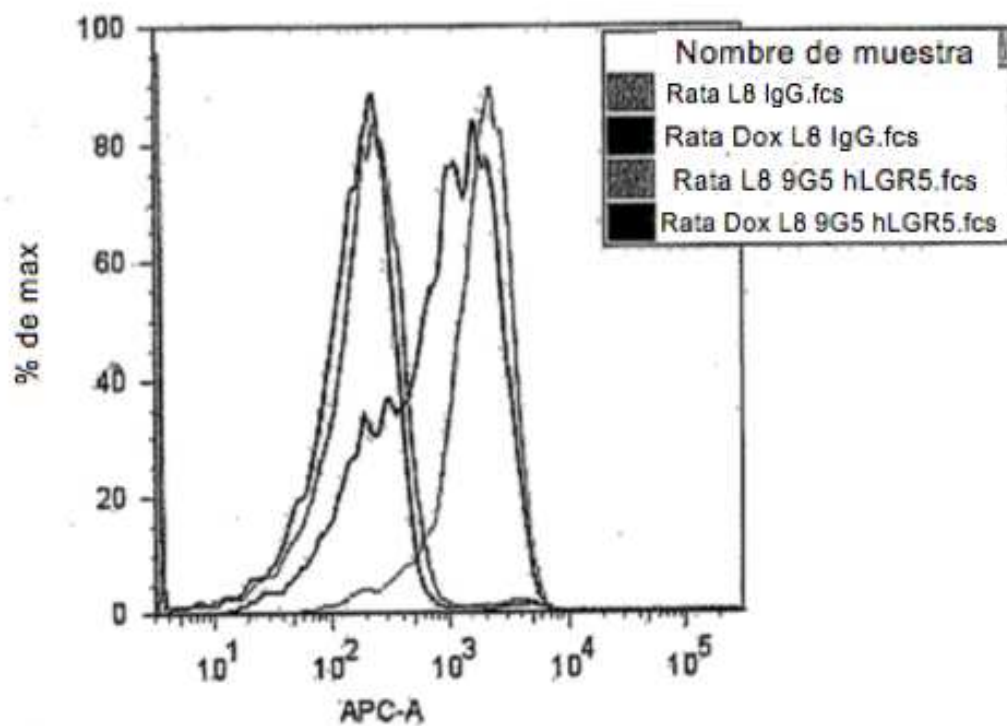


Figura 24



Muestras	Media fluorescente
Rata L8 9G5 hLGR5.fcs	2057,3
Rata Dox L8 9G5 hLGR5.fcs	1213,85
Rata L8 IgG hLGR5.fcs	440,73
Rata Dox L8 IgG hLGR5.fcs	237,50

Figura 25

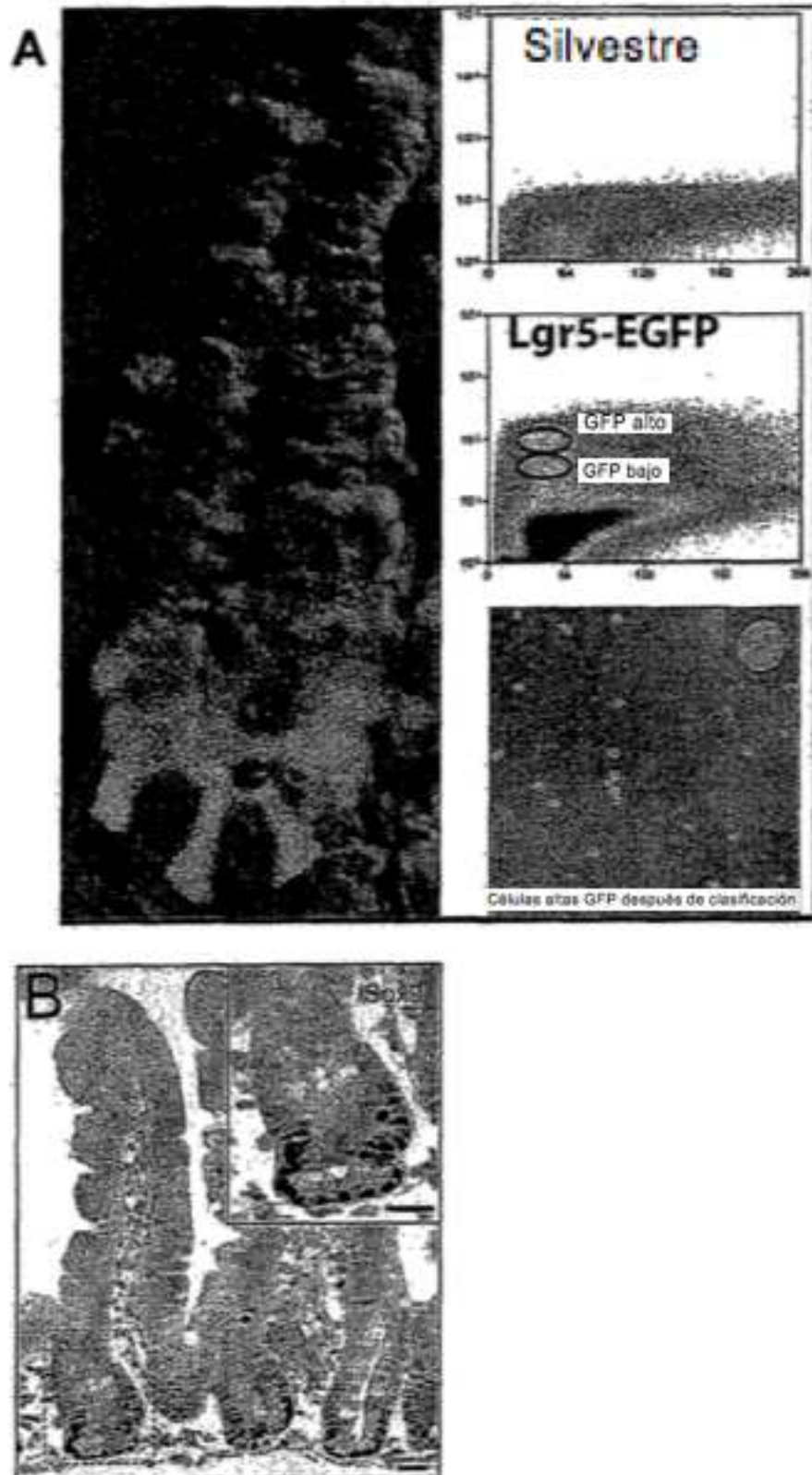
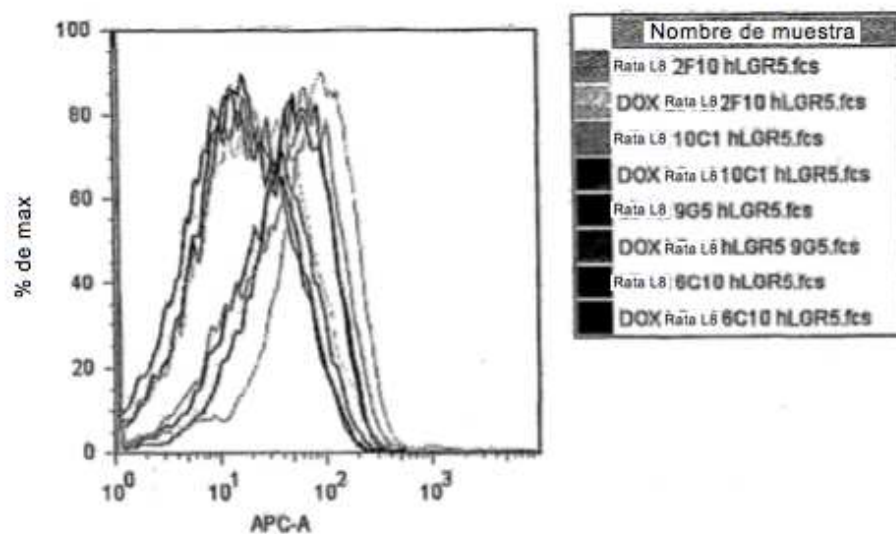


Figura 26



FSC-A, SSC-A subconjunto

Muestras	Media (APC)
Rata L8 6C10 hLGR5.fcs	61,74
Rata L8 9G5 hLGR5.fcs	54,22
Rata L8 10C1 hLGR5.fcs	65,29
DOX rata L8 6C10 hLGR5.fcs	23,89
DOX rata L8 hLGR5 9G5.fcs	28,95
DOX rata L8 10C1 hLGR5.fcs	22,21
DOX rata L8 2F10 hLGR5.fcs	48,06
Rata L8 2F10 hLGR5.fcs	92,92

Figura 27

LGR5:

NR 2F10 LC (cadena ligera)

GACATTCAGATGACGCAGTCTCCTTCACTACTGTCTGCATCTGTGGGAGACAG
AGTCACTCTCAACTGCAAAGCAGGT*CAGAATATCAACAATTATTTAGCCTGGT*
ATCAGCAAAAGCTTGGGGCAGCTCCCAAAGTCCTGATATTT*TATGCAAA*CAGT
TTGCAAACGGGCATCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATT
ACACACTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTTCTGC
*CAGCAGTATTACATTTGGACCACG*TTTGGAGCTGGGACCAAGGTGGAAGTGA
AACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCTATCTTCCCACCATCCACGGAACA
GTTAGCAACTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCCTCATGAACAACCTTCTATCCC

LGR6:

OL 6d8 HC (cadena pesada)

GATGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTAGTGCAGCCTGGAAGGTCTC
TGAAACTATCCTGTGTAGCCTCTGGATT*CACATTCAATAACTACTGGATGACCT*
GGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATCC*ATTACTAA*
*TACTGGTGGAAACACTT*ACTATCCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACTATCT
CCAGAGATAATGCAATAAGTACCCTGTACCTGCAAATGAACAGCCTGACGTC
TGAGGACACGGCCACGTATTACTGT*ACAAGCGAGGGAGGGAGTGGGCTTGAT*
TATTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCC
C

OL 2F4 HC (cadena pesada)

GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCTGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGTCAC
TCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAAGAATTACTGGGGCT
GGATCCGGAAGTTCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGATACATAAGCCA
CAGTGGTAGTATTAAGTACAATACATCTCTCAAAAGTCGAATCTCCATTACTA
GAGACACTTCGAAGAATCAGTTCTTCTGCAGTTGAACTCTCTAACTACTGAG
GACACAGCCACATATTACTGTGCAAGTCAA*ACTACCCGAGGTTTTGCTTACTG*
GGGCCAGGGCACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCC