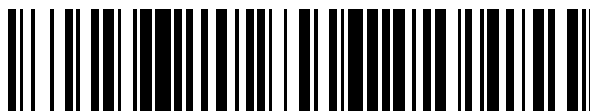


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 555**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/18** (2006.01)

**A61K 31/5415** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/095** (2010.01)

**C12Q 1/02** (2006.01)

**C12Q 1/06** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**C40B 30/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2013 PCT/CA2013/000182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13126993**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013 E 13755576 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2820148**

54 Título: **Ensayos de detección para identificación y validación de agentes que se dirigen a células madre de cáncer**

30 Prioridad:

**28.02.2012 WO PCT/CA2012/000175**  
**06.09.2012 US 201213605609**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.10.2017**

73 Titular/es:

**MCMaster UNIVERSITY (100.0%)**  
**1280 Main Street West**  
**Hamilton, ON L8S 4L8**

72 Inventor/es:

**BHATIA, MICKIE;**  
**SACHLOS, ELEFThERIOS;**  
**RISUEÑO, RUTH MUÑOZ y**  
**COLLINS, TONY**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 639 555 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Ensayos de detección para identificación y validación de agentes que se direccionan a células madre de cáncer

## 5 Campo de la divulgación

La invención se refiere a un método para identificar y validar un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer, comprendiendo el método: i) poner en contacto una o más variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba y una o más células madre normales con el agente de prueba; ii) detectar un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba, y detectar un cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al agente de prueba; iii) identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el contacto con el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales; y opcionalmente iv) poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales con el agente de prueba en una pluralidad de concentraciones de prueba y detectar un cambio en el recuento de células para una o más variantes de células madre neoplásicas y para las células madre normales en la pluralidad de las concentraciones de prueba; en donde el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de poner en contacto las células con el agente de prueba y se detecta el cambio en el recuento de células para las células madre normales entre aproximadamente 4 días y 6 días después de poner en contacto las células con el agente de prueba. También se discuten métodos para el pronóstico o tratamiento de cáncer y métodos de detección y particularmente métodos para el pronóstico o tratamiento de cáncer que se dirigen a receptores de dopamina y métodos de detección para la identificación y validación de agentes que se dirigen a células madre de cáncer.

25

## Antecedentes de la divulgación

Las crecientes evidencias sugieren que el desarrollo de un cáncer/tumor se debe a una rara población de células, denominadas células madre de cáncer (CMC) (Dick, Jordan, 2009, Reya et al., 2001) que son únicamente capaces de iniciar y sostener la enfermedad. Además, la evidencia experimental indica que los quimioterapéuticos convencionales, caracterizados por su capacidad para inhibir la proliferación celular de líneas celulares de cáncer (Shoemaker, 2006) o reducir la carga tumoral en modelos murinos (Frese y Tuveson, 2007), son ineficaces contra CMC humanas (Guan et al. al., 2003, Li et al., 2008). Esta resistencia a los quimioterapéuticos está acompañada de una citotoxicidad indiscriminada que a menudo afecta a las células madre y progenitoras sanas, lo que conduce a la restricción de dosis y requiere un tratamiento de soporte (Smith et al., 2006). Ejemplos recientes a lo largo de estas líneas incluyen la inducción selectiva de apoptosis (Gupta et al., 2009, Raj et al., 2011) que aún debe ser probada en SC normales y en el sistema humano. Por consiguiente, la identificación de agentes que se dirigen solamente a las CMC es ahora crítica para proporcionar fármacos anticancerígenos verdaderamente selectivos para las pruebas preclínicas.

40

Las SC normales y neoplásicas se definen funcionalmente mediante un equilibrio estrechamente controlado entre el potencial de autorrenovación frente a la diferenciación. En el caso de CMC, este equilibrio se desplaza hacia una autorrenovación y supervivencia mejoradas que conduce a una limitada capacidad de diferenciación que eventualmente permite el crecimiento de tumores. En contraste con los efectos tóxicos directos que afectan igualmente a las SC normales, un enfoque alternativo para erradicar las CMC es mediante la modificación de este equilibrio a favor de la diferenciación en un esfuerzo por agotar la población de CMC. La identificación de moléculas que se dirigen selectivamente a CMC somáticas mientras se ahorra la capacidad de SC sanas sería por lo tanto útil para el desarrollo de nuevos tratamientos diagnósticos y terapéuticos para dirigirse selectivamente a CMC humanas.

Se han descrito métodos para descubrir compuestos anticancerígenos que tienen un efecto selectivo sobre células cancerosas en comparación con el efecto de los compuestos sobre células normales (documento US 6.180.357) en los que se han descubierto fármacos anti-CMC. Sin embargo, la identificación de las CMC requiere avances en tecnología. Se requieren diversos avances para descubrir compuestos selectivos anti-CMC. Algunos de ellos incluyen el crecimiento de un número suficientemente alto tanto de CMC como de células madre normales (NSC), teniendo estas células que permanecer en estado no diferenciado, teniendo células madre que son suficientemente robustas para un cribado de alto rendimiento que incluye manipulación robótica, dispensación de soluciones, transporte y desarrollo de los puntos finales de células madre relevantes adecuados para el cribado de alto rendimiento. El número de celdas disponibles para alto rendimiento es una limitación técnica importante. El aislamiento primario es desafiante ya que las células madre son raras *in vivo* y por lo tanto el cultivo de células madre permite la amplificación del número de células madre disponibles. Las células madre en cultivo tienden a diferenciarse y no conservan sus características de células madre en cultivo. Un ejemplo de la diferencia entre el cultivo de células madre y el cultivo de células en general es que el cultivo de células madre requiere condiciones libres de antibióticos para evitar la diferenciación. La limitación del número de células es evidente en Kondo (WO2006051405A2) ya que la selección de poblaciones laterales (como sustituto de una CMC) por Hoechst 3334 es limitante, dado que este colorante es tóxico para las células madre (Machaliński et al., 1998). En el cultivo a granel, como se describe en Kondo, una población lateral forma dos poblaciones de células, una población lateral y una

65

población no lateral de células. El cultivo no mantiene un grupo puro de células de población lateral y requiere el reaslamiento de la población lateral con Hoechst 3334 disminuyendo así el número de células. Esta cuestión también impide la determinación de los puntos finales de las células mixtas en el cultivo, ya que una población pura no puede ser controlada directamente. Además, el subcultivo y el análisis de subpoblaciones no es posible porque el cultivo de células crea poblaciones mixtas. Aunque Kondo reivindica métodos para descubrir compuestos selectivos de CMC, la incapacidad para mantener poblaciones de células puras, la demostración de los efectos celulares normales por los mismos compuestos y su comparación con la población lateral descrita como un modelo de CMC en forma de alto rendimiento es una limitación del estado actual de la técnica para descubrir fármacos selectivos de CMC.

Del mismo modo, Tyers (documento US 8.058.243), ilustra otras limitaciones en el estado actual de la técnica. Tyers divulga un ensayo de neuroesferas clonogénicas para identificar moduladores potentes y/o selectivos de proliferación, diferenciación y/o renovación de células precursoras neurales, células progenitoras neurales y/o células madre neurales autorrenovables y multipotentes. El cribado se dirigió a compuestos activos en un ensayo de células madre, y no necesariamente dirigidos a CMC. El cribado opuesto fue una línea de células de astrocitos en lugar de una línea de células madre normales, de modo que el cribado opuesto detecta células madre frente a la actividad celular diferenciada en lugar de una actividad selectiva de CMC frente a NSC. A partir de los compuestos activos, se divulgaron ensayos de un subconjunto de doce (12) células contra células precursoras de meduloblastoma que se enriquecen para CMC, pero no son una población pura de CMC. El descubrimiento de compuestos anti-CMC se basó en la búsqueda de compuestos activos contra células neuroesferas y pruebas adicionales. Dado que las neuroesferas contienen células madre y células progenitoras del linaje neural, la facilidad para descubrir compuestos selectivos anti-CMC se excluye porque el primer paso de su cribado está dirigido a células madre normales. Por lo tanto, en Tyers el desafío de descubrir compuestos anti-CMC a través de alto rendimiento es evidente ya que enseñan a identificar compuestos de células madre activas primero mediante un cribado de alto rendimiento, probando luego un subconjunto sobre células enriquecidas con CMC.

Las neoplasias malignas hematológicas son tipos de cáncer que afectan a la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Las neoplasias malignas hematológicas pueden derivarse de cualquiera de los dos principales linajes de células sanguíneas: las líneas celulares mieloides y linfoides. Ejemplos de neoplasias malignas mieloides incluyen leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide crónica.

Aunque las neoplasias malignas mieloides generalmente se consideran que todas surgen de precursores del linaje mieloide en la médula ósea, son altamente divergentes en su presentación, patología y tratamiento. Por ejemplo, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2008 para las neoplasias mieloproliferativas (véase Tefferi et al., *Cancer*, 1 de septiembre, pp. 3842-3847 (2009); también Vannucchi et al., *Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms* CA Cancer J. Clin. 2009, 59: 171-191), identifica 5 esquemas de clasificación diferentes para neoplasias mieloides y coloca la leucemia mieloide aguda (LMA) en una categoría separada de la leucemia mielógena crónica (LMC) y otras neoplasias mieloproliferativas. Además, la LMC se caracteriza a menudo por contener la translocación de BCR-Abl que está ausente en la LMA. Los tratamientos preferidos para leucemias, tales como neoplasias malignas mieloides, apuntarían a células leucémicas sin afectar indebidamente a las poblaciones de células madre hematopoyéticas.

La tioridazina es un antagonista del receptor de dopamina que pertenece al grupo de fármacos de fenotiazina y se utiliza como un antipsicótico. Ha estado en uso clínico desde 1959, sin embargo, debido a preocupaciones sobre cardiotoxicidad y retinopatía en dosis altas, este fármaco no se prescribe comúnmente, y está reservado para pacientes que no han respondido o tienen contraindicaciones para los antipsicóticos más ampliamente utilizados. Se ha informado que los pacientes esquizofrénicos que reciben medicación antagonista del receptor de dopamina en dosis consideradas eficaces para la esquizofrenia tienen una incidencia reducida de cáncer de recto, colon y próstata en comparación con la población general.

Sean et al. (*Blood*, vol. 119, no. 5, pp. 1200-1207) describe una estrategia de cribado de moléculas pequeñas (2011) que descubre la eficacia terapéutica del ribósido de kinetina. Guzman et al. (*Blood*, vol. 105, no. 11, pp 4163-4169, 2005) indica que la lactona sesquiterpénica partenólido induce la apoptosis de las células madre y progenitoras de la leucemia mielógena aguda humana.

Existe una necesidad de nuevos métodos para la identificación y validación de agentes que se dirigen a células madre de cáncer.

#### Resumen de la divulgación

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones y cualquier objeto que no cae dentro del alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención, sino que sólo sirve como información de los antecedentes para comprender mejor la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar y validar un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer, comprendiendo el método: i) poner en contacto una o más variantes

- de células madre neoplásicas con el agente de prueba y una o más células madre normales con el agente de prueba; ii) detectar un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba, y detectar un cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al agente de prueba; iii) identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el contacto con el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales; y opcionalmente iv) poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales con el agente de prueba en una pluralidad de concentraciones de prueba y detectar un cambio en el recuento de células para una o más variantes de células madre neoplásicas y para las células madre normales en la pluralidad de las concentraciones de prueba; en donde el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba y se detecta el cambio en el recuento de células para las células madre normales entre aproximadamente 4 días y 6 días después poniendo en contacto las células con el agente de prueba.
- 15 Convenientemente, el método puede comprender además antes de la etapa i) detectar un cambio en la pluripotencia y un cambio en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con el agente y seleccionar un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas.
- 20 Convenientemente, la pluralidad de concentraciones de prueba puede variar en al menos aproximadamente 3, 4 o 5 órdenes de magnitud, o la pluralidad de concentraciones puede variar al menos desde aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$ , o al menos de aproximadamente 10 nM hasta aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , o la pluralidad de concentraciones de prueba puede comprender al menos una serie de diluciones de 8 puntos.
- 25 De manera adecuada, la etapa de identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer puede comprender comparar una curva de respuesta a la dosis para el cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con el agente de prueba a la pluralidad de concentraciones de prueba a una curva de respuesta a la dosis para el cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al contacto con el agente de prueba a la pluralidad de concentraciones de prueba, opcionalmente puede comprender además determinar para el agente de prueba un valor concentración efectiva máxima para el 50% (CE50) para la disminución en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas y un valor de CE50 para la disminución en el recuento de células en las células madre normales, opcionalmente puede comprender además la determinación de una relación del valor de CE50 para la disminución en el recuento de células para las células madre normales en relación con el valor de CE50 para la disminución en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas, opcionalmente en donde el agente de prueba puede identificarse como un agente selectivo contra células madre de cáncer si la relación de los valores de CE50 es mayor que 3.
- 40 Adecuadamente, las variantes de células madre neoplásicas pueden sembrarse en un primer receptáculo a razón de aproximadamente 3.000 a 7.000 células por receptáculo y las células madre normales pueden sembrarse en un segundo receptáculo a razón de aproximadamente 8.000 a 12.000 células por receptáculo, opcionalmente en donde las variantes de células madre neoplásicas pueden ser sembradas a razón de aproximadamente 4.000 a 6.000 células por receptáculo, opcionalmente alrededor de 5.000 células por receptáculo, opcionalmente en donde las células madre normales pueden ser sembradas a razón de aproximadamente 9.000 a 11.000 células por receptáculo, opcionalmente alrededor de 10.000 células por receptáculo.
- 50 Convenientemente, el primer receptáculo y el segundo receptáculo pueden ser pozos en la misma placa de microtitulación o en pozos en placas de microtitulación separadas, opcionalmente en donde la placa de microtitulación puede ser una placa de microtitulación de 96 pozos, opcionalmente una placa de microtitulación recubierta de 96 pozos.
- 55 De manera adecuada, el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas puede detectarse entre aproximadamente 72 horas después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba y el cambio en el recuento de células para las células madre normales puede detectarse entre aproximadamente 5 días después poner en contacto las células con el agente de prueba; o adecuadamente el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas puede detectarse entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba, opcionalmente aproximadamente 72 horas, y el cambio en el recuento de células para las células madre normales puede ser detectada entre aproximadamente 4 días y 6 días después de poner en contacto las células con el agente de prueba, opcionalmente aproximadamente 5 días, y el cambio en la pluripotencia para las variantes de células madre neoplásicas puede detectarse entre 48 y 96 horas después de ponerse en contacto las variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba, opcionalmente, aproximadamente 72 horas después de poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba.
- 65 Convenientemente, las variantes de células madre neoplásicas pueden ser células madre pluripotentes humanas transformadas (CMPht), opcionalmente células v1 H9-Oct4-GFP o células madre pluripotentes inducidas

transformadas, (CMPit).

Convenientemente, las células madre normales pueden ser células madre pluripotentes, o células madre pluripotentes inducidas, o células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos.

Convenientemente, el método puede comprender además el cribado del agente de prueba identificado como un agente selectivo contra células madre de cáncer para la actividad en una línea celular de cáncer derivada de un sujeto con cáncer, opcionalmente en donde la línea celular de cáncer es una línea celular leucémica, opcionalmente una línea celular de leucemia mieloide aguda (LMA).

Convenientemente, la actividad puede ser citotoxicidad, inducción de apoptosis, pérdida de pluripotencia, inducción de diferenciación, o combinaciones de los mismos.

Convenientemente, el método puede comprender adicionalmente antes de la etapa i) cribar uno o más agentes para identificar uno o más agentes de prueba que inducen pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas, que comprende opcionalmente antes de la etapa i) poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas con el agente, detectar un cambio en la pluripotencia y un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente y seleccionar un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas, opcionalmente en donde las variantes de células madre neoplásicas se ponen en contacto con el agente a aproximadamente 10  $\mu$ M.

Adecuadamente, la pluralidad de agentes se puede cribar en una placa de microtitulación e identificarse como agentes de prueba basándose en una desviación estándar umbral respecto a la media, opcionalmente un umbral de una puntuación Z de al menos 3 desviaciones estándar respecto a la media, opcionalmente de la media en toda la placa para el cambio en la pluripotencia y el cambio en el recuento de células.

Convenientemente, las variantes de células madre neoplásicas pueden tratarse con la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) para inducir la pérdida de pluripotencia se usan como un control positivo, opcionalmente en donde las células se tratan con al menos 100 ng/mL de BMP4.

De manera adecuada, el cambio en la pluripotencia de las variantes de células madre neoplásicas puede detectarse detectando un cambio en el nivel de expresión de uno o más marcadores de pluripotencia, opcionalmente en donde la detección de la expresión de uno o más marcadores de pluripotencia comprende el uso de anticuerpos selectivos para los uno o más marcadores de pluripotencia, opcionalmente en donde la expresión de uno o más marcadores de pluripotencia en una o más variantes de células madre neoplásicas está unida operativamente a un gen informador, opcionalmente en donde el marcador de pluripotencia se selecciona de Oct4 y Sox2, opcionalmente en donde el marcador de pluripotencia se selecciona de Oct4, Sox2, Nanog, SSEA3, SSEA4, TRA-1 -60, TRA-1-81, receptor de IGF1, conexina 43, E-cadherina, fosfatasa alcalina, REX1, CRIPTO, CD24, CD90, CD29, CD9 y CD49f, y mezclas de los mismos.

El descubrimiento de fármacos dirigidos a CMC se puede abordar a través de varias metodologías. La maquinaria molecular que distingue una CMC de una célula madre normal no está bien dilucidada. Hay marcadores que pueden estar asociados con CMC, pero hay una escasez de tales marcadores, y no necesariamente pueden ser objetivos para el descubrimiento de fármacos. Además, la selección de compuestos que se dirigen a células madre y potencialmente pueden agotar la combinación de células madre a través de la inducción de la diferenciación o reducir su número a través de una variedad de mecanismos, necesita ser selectiva para evitar los mismos efectos sobre las células madre normales, resultando en toxicidad indebida de tratamiento. Por lo tanto, existe la necesidad de una metodología para descubrir fármacos que tengan diferentes efectos sobre las CMC en comparación con otras células.

Se proporciona aquí un método que se puede usar para identificar compuestos que exhiben un nivel diferente de actividad biológica o que tienen una selectividad por las CMC en comparación con otros tipos de células tales como células madre normales. El método utiliza una línea celular reproducible, que actúa como un sustituto, que tiene características asociadas con la progresión neoplásica, permitiendo de este modo el ensayo de alto rendimiento de miles de compuestos para la actividad contra células madre de cáncer y denominadas aquí como células madre neoplásicas transformadas. Una línea celular adecuada para esta prueba se proporciona en el documento PCT/CA2010/001340. El método proporcionado aquí brinda un enfoque multifactorial al proceso de comparación del efecto de un compuesto sobre una o más CMC con más de un valor o resultado predeterminado. Tales resultados pueden determinarse midiendo la muerte celular, la pérdida de pluripotencia, morfología, recuento de células y la respuesta al estrés celular, entre otros. Además, el presente método proporciona el cálculo de una relación de potencia de actividad selectiva (RPAS), definida como la relación de la CE50 para una célula normal frente a la CE50 de la línea celular sustituta, que permite al experto seleccionar compuestos objetivo con un nivel de precisión más alto que el permitido anteriormente. Se prefiere la utilización de una serie de comparaciones de rangos de dosis, ya que, en cualquier dosis única o un pequeño intervalo de dosis, la diferencia entre el efecto de los compuestos sobre cada clase de células puede no ser evidente. El método comprende comparar el efecto de un

compuesto sobre una o más CMC tales como variantes de células madre neoplásicas con el efecto del compuesto sobre una o más células madre normales. El efecto del compuesto sobre una o más células madre normales se determina experimentalmente poniendo en contacto una o más células madre con el compuesto y detectando el efecto del compuesto en una o más de las SC, opcionalmente en donde el efecto es indicativo de la actividad biológica del compuesto.

Los inventores han determinado que el uso de un método de cribado en dos etapas es particularmente útil para identificar y validar agentes selectivos contra células madre de cáncer. En una primera etapa, los agentes se criban para provocar un cambio tanto en la pluripotencia y/o en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas como opcionalmente para causar un cambio tanto en la pluripotencia como en el recuento de células para seleccionar agentes de prueba. En una segunda etapa, los agentes de prueba seleccionados en la primera etapa como causantes de una reducción en la pluripotencia y/o conteo celular de variantes de células madre neoplásicas se prueban para causar un efecto diferencial en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas con respecto a células madre normales. El uso del método de dos etapas proporciona una serie de ventajas sobre los métodos de cribado convencionales y permite la identificación de agentes selectivos contra células madre de cáncer que de otro modo podrían clasificarse como no selectivos o no prometedores en métodos de cribado convencionales. Además, las células madre humanas normales son generalmente más difíciles de cultivar en cultivo en comparación con las variantes de células madre neoplásicas. Los agentes de cribado en una primera etapa que utilizan células madre neoplásicas antes de buscar actividad diferencial usando células madre humanas normales reduce el tiempo y los recursos necesarios para identificar y validar agentes selectivos contra células madre de cáncer. La identificación de agentes contra células madre de cáncer que son selectivos aumenta la probabilidad de que aquellos agentes progresen a través de las etapas de desarrollo de fármacos, ya que existe un menor riesgo de que los agentes afecten a células madre normales, disminuyendo así la probabilidad de efectos secundarios en comparación con agentes no selectivos.

Los inventores han determinado que la tioridazina es citotóxica para las células madre de cáncer y en particular las que dan lugar a leucemia mieloide aguda (LMA). Además, a concentraciones tóxicas para las células madre de cáncer, se ha encontrado que la tioridazina tiene un efecto relativamente limitado sobre las células madre normales, tales como las células madre hematopoyéticas. La presente exposición explora un procedimiento multifactorial para cuantificar la capacidad de compuestos similares a tioridazinas, caracterizados como aquellos que tienen una estructura similar a la tioridazina y que presentan un coeficiente de Tanimoto  $> 0,6$ , para tener efectos sobre CMC.

Se descubrió sorprendentemente que de 167 terapias de cáncer conocidas o utilizadas actualmente sólo el 5% exhibía efectos contra las CMC. Por lo tanto, la presente invención satisface una necesidad sentida en la técnica de proporcionar un método para elucidar compuestos que nunca se han utilizado para tratar pacientes clínicamente con cáncer, por tener potentes efectos sobre las CMC cuando incluso los compuestos clínicos para el cáncer tienen una probabilidad tan baja de tener efectos contra las CMC.

Por consiguiente, en un aspecto de la descripción se proporciona un método para identificar y validar un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer. El método comprende:

poner en contacto una o más variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba y una o más células madre normales con el agente de prueba;

detectar un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba y detectar un cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al agente de prueba; e

identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el contacto con el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales, donde el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de poner en contacto las células con el agente de prueba y se detecta el cambio en el recuento de células para las células madre normales entre aproximadamente 4 días y 6 días después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba.

En una realización, el método comprende detectar un cambio en el recuento de células en respuesta al agente de prueba en un cierto número de diferentes concentraciones de prueba. De acuerdo con esto, en una realización, el método incluye poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales con el agente de prueba en una pluralidad de concentraciones de prueba y detectar un cambio en el recuento de células para una o más variantes de células madre neoplásicas y para las células madre normales a la pluralidad de concentraciones de prueba.

En un aspecto relacionado de la descripción, se proporciona un método de dos etapas para identificar y validar un agente como un agente selectivo contra células madre de cáncer. En una primera etapa, los agentes identificados como causantes de una pérdida de pluripotencia y que provocan una reducción en el recuento de células se

identifican como agentes de prueba para un análisis posterior en una segunda etapa. En una realización, el método comprende una primera etapa de detección de un cambio en la pluripotencia y un cambio en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con el agente y selección de un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas. En una realización, el método comprende una segunda etapa de poner en contacto una o más variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba y poner en contacto una o más células madre normales con el agente de prueba, detectar un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba, detectar un cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al agente de prueba e identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales.

También se ha determinado que los agentes contra células madre de cáncer presentan curvas complejas de respuesta a la dosis de tal manera que su selectividad y/o actividad no pueden determinarse fácilmente extrapolando los resultados de ensayar un agente o agente de prueba usando un número único o pequeño de las concentraciones de prueba. Los métodos descritos en el presente documento opcionalmente implican poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas y/o las células madre normales con el agente de prueba en una pluralidad de concentraciones de prueba.

En una realización, la pluralidad de concentraciones de prueba varía en al menos aproximadamente 3, 4 o 5 órdenes de magnitud o más de 5 órdenes de magnitud. En una realización, la pluralidad de concentraciones varía al menos desde aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$ , o al menos desde aproximadamente 10 nM hasta aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ . Opcionalmente, la pluralidad de concentraciones de prueba puede ser una serie de dilución, tal como una serie de dilución de 8 puntos o de 10 puntos.

En una realización, los métodos descritos aquí implican comparar una curva de respuesta a la dosis para el cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con el agente de prueba en la pluralidad de concentraciones de prueba, con una curva de dosis-respuesta para el cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al contacto con el agente de prueba a la pluralidad de concentraciones de prueba. Una persona experta apreciará que se pueden utilizar una serie de métodos diferentes para comparar curvas de respuesta a la dosis. Por ejemplo, en una realización se determina un valor medio de concentración eficaz máxima (CE50) de un agente de prueba para una disminución en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas, y se determina un valor CE50 para una disminución en el recuento de células en las células madre normales.

En una realización, se pueden comparar valores de CE50 o mediciones similares para proporcionar una relación de actividad selectiva para el agente de prueba. Por ejemplo, en una realización los métodos incluyen determinar una relación del valor de CE50 para la disminución en el recuento de células para las células madre normales en relación con el valor CE50 para la disminución en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas. Opcionalmente, los métodos descritos en la presente memoria incluyen además identificar un agente de prueba como un agente selectivo contra células madres de cáncer si la relación de los valores de CE50 es mayor de 1, 2, 3, 4, 5 o mayor de 5.

En un aspecto de la descripción, las variantes de células madre neoplásicas y/o células madre normales se siembran en un receptáculo antes de poner en contacto las células con un agente o agente de prueba. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas se siembran en un primer receptáculo de aproximadamente 3.000 a 7.000 células por receptáculo y las células madre normales se siembran en un segundo receptáculo a razón de aproximadamente 8.000 a 12.000 células por receptáculo. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas se siembran a razón de aproximadamente a razón de 4.000 a 6.000 células por receptáculo, opcionalmente aproximadamente 5.000 células por receptáculo. En una realización, las células madre normales se siembran a razón de aproximadamente 9.000 a 11.000 células por receptáculo, opcionalmente aproximadamente 10.000 células por receptáculo.

Opcionalmente, el primer receptáculo y/o el segundo receptáculo son pozos en la misma placa de microtitulación o pozos en placas de microtitulación separadas. En una realización, la placa de microtitulación es una placa de microtitulación de 96 pozos, opcionalmente una placa de microtitulación recubierta de 96 pozos tal como una placa Matrigel<sup>MR</sup>.

El cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de poner en contacto las células con el agente de prueba, opcionalmente aproximadamente 72 horas. El cambio en el recuento de células para las células madre normales se detecta entre aproximadamente 4 días y 6 días después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba, opcionalmente durante aproximadamente 5 días.

En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las variantes de células madre neoplásicas se transforman en células madre pluripotentes humanas transformadas (CMPht) o en células madre pluripotentes

inducidas transformadas (CMPit). En una realización, las variantes de células madre neoplásicas son variantes de células madre neoplásicas humanas.

Se determina un cambio en el recuento de células para las células madre neoplásicas y/o las células madre normales. En una realización, el cambio en el recuento de células se determina mediante análisis del contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN), detección de un marcador nuclear tal como histonas o laminina nuclear, condensación nuclear y/o detección nuclear tal como mediante tinción con fluorocromos que se unen al ADN tales como Hoechst, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), naranja de acridina, DRAQ5 o safarina. Una persona experta apreciará que la detección de un cambio en el recuento de células puede incluir la identificación y/o cuantificación de células individuales. Opcionalmente, el cambio en el recuento de células se detecta utilizando análisis de alto contenido y/o análisis de imágenes nucleares.

En una realización, los métodos descritos en la presente memoria descriptiva incluyen el cribado de un agente de prueba identificado como un agente selectivo contra células madre de cáncer para la actividad en una línea celular de cáncer, tal como una línea celular derivada de un sujeto con cáncer. En una realización, la línea celular de cáncer es una línea celular leucémica, tal como una línea celular de leucemia mieloide aguda (LMA). En una realización, la actividad es citotoxicidad, inducción de apoptosis, pérdida de pluripotencia, inducción de diferenciación, o combinaciones de los mismos. En una realización, la actividad es la presencia/ausencia o nivel o uno o más biomarcadores.

En una realización, los métodos descritos en la presente memoria descriptiva incluyen el cribado de un agente de prueba identificado como un agente selectivo contra células madre de cáncer para inducir la expresión de uno o más genes de respuesta al estrés. En una realización, los genes de respuesta al estrés son uno o más biomarcadores apoptóticos tales como Anexina V, p53 y/o p21.

En otro aspecto de la descripción, se criban uno o más agentes para identificar uno o más agentes de prueba que inducen pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas. Estos agentes de prueba pueden entonces ser identificados y validados como agentes selectivos contra células madre de cáncer usando los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, comparando cambios en el recuento de células en respuesta al agente de prueba en variantes de células madre neoplásicas y células madre normales.

En una realización, el método incluye poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas con el agente, detectar un cambio en la pluripotencia y un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente y seleccionar un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas se ponen en contacto con el agente a razón de aproximadamente 10  $\mu$ M. En una realización, se criban una pluralidad de agentes en una placa de microtitulación y se identifican como agentes de prueba con base en una desviación estándar umbral de la media u otra estadística adecuada. Por ejemplo, en una realización el umbral es una puntuación Z de al menos 3 desviaciones estándar de la media, opcionalmente de la media en toda la placa para el cambio en la pluripotencia y cambio en el recuento de células. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas se tratan con BMP4 para inducir la pérdida de pluripotencia como control positivo, opcionalmente al menos 100 ng/mL de BMP4.

Una persona experta apreciará que pueden utilizarse una serie de métodos diferentes conocidos en la técnica para detectar un cambio en la pluripotencia de las variantes de células madre neoplásicas detectando un cambio en el nivel de expresión de uno o más marcadores de pluripotencia. Una realización incluye detectar la expresión de uno o más marcadores de pluripotencia usando anticuerpos selectivos para uno o más marcadores de pluripotencia. En una realización, la expresión de uno o más marcadores de pluripotencia en las variantes de células madre neoplásicas o células madre normales está operativamente enlazada a un gen indicador, tal como GFP. En una realización, el marcador de pluripotencia se selecciona entre Oct4 y Sox2. En una realización, el marcador de pluripotencia se selecciona entre Oct4, Sox2, Nanog, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, receptor de IGF1, conexina 43, E-cadherina, fosfatasa alcalina, REX1, CRIPTO, CD24, CD90, CD29, CD9 y CD49f, y mezclas de los mismos.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para identificar y validar un agente de prueba como un agente selectivo contra células madres de cáncer que comprende:

poner en contacto una o más variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba y una o más células madre normales con el agente de prueba;

detectar un cambio en una o más actividades de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba,

detectar un cambio en una o más actividades de las células madre normales en respuesta al agente de prueba; e



- identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el contacto con el agente de prueba induce una o más actividades en las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una actividad comparable en las células madre normales en las que el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de poner en contacto las células con el agente de prueba y se detecta el cambio en el recuento de células para las células madre normales entre aproximadamente 4 días y 6 días después de poner en contacto las células con el agente de prueba.
- En una realización, la actividad es apoptosis, necrosis, proliferación, división celular, diferenciación, migración o movimiento, presencia o ausencia de uno o más biomarcadores, nivel de uno o más biomarcadores, o inducción de los mismos.
- En otro aspecto, se proporciona un método de dos etapas para identificar y validar un agente como un agente selectivo contra células madre de cáncer, que comprende:
- 15 detectar un cambio en una o más actividades de variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con el agente y seleccionar un agente como agente de prueba si el agente induce una o más actividades en las variantes de células madre neoplásicas; y
  - 20 poner en contacto una o más variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba y poner en contacto una o más células madre normales con el agente de prueba, detectar un cambio de una o más actividades de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba, detectar un cambio en una o más actividades de las células madre normales en respuesta al agente de prueba e identificación del agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el agente de prueba induce una o más actividades en las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una actividad comparable en el las células madre normales.
  - 25 En una realización, la actividad es apoptosis, necrosis, proliferación, división celular, diferenciación, migración o movimiento, presencia o ausencia de uno o más biomarcadores, nivel de uno o más biomarcadores o inducción de los mismos.
  - 30 Se ha determinado sorprendentemente que los compuestos estructuralmente similares a la tioridazina son eficaces para inducir la diferenciación de células madre de cáncer o para matar células madre de cáncer.
  - 35 En una realización, los compuestos tienen un coeficiente de similitud de Tanimoto con la tioridazina de al menos 0,6. En una realización, los compuestos tienen un coeficiente de similitud de Tanimoto con la tioridazina de al menos 0,7, 0,8, 0,9 o 0,95. Opcionalmente, los compuestos incluyen, pero no se limitan a, tioridazina, proclorperazina, trifluoperazina, flufenazina, perfenazina y triflupromazina. En una realización, los compuestos son derivados de fenotiazina. En una realización, el compuesto induce preferentemente la diferenciación de células madre de cáncer con respecto a las células madre normales. Por ejemplo, en una realización los compuestos inducen preferentemente la diferenciación de variantes de células madre neoplásicas con respecto a células madre normales.
  - 40 La invención sólo contempla métodos *in vitro*. El origen de las células madre de cáncer usadas en la invención puede ser *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En una realización, el origen de las células madre de cáncer es *in vivo*, de un sujeto con cáncer. En una realización, el cáncer es leucemia, tal como leucemia mieloide aguda. En una realización, el cáncer es cáncer de mama. En una realización, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de cerebro o cáncer de próstata.
  - 45 Los métodos descritos aquí también son útiles para controlar o tomar decisiones de tratamiento para un sujeto con cáncer o sospechoso de tener cáncer sometido a tratamiento con un agente contra células madre de cáncer.
  - 50 En algunas realizaciones, el agente contra células madre de cáncer es tioridazina, un compuesto con similitud estructural con la tioridazina, o un derivado de fenotiazina.
  - 55 En algunas realizaciones, determinar un nivel de células madre de cáncer en la muestra comprende determinar el nivel de células madre de cáncer en la muestra con relación a otro tipo de células en la muestra, tales como células diferenciadas. Opcionalmente, los métodos descritos en la presente memoria incluyen la determinación de un cambio en la fracción de células madre de cáncer en relación con células diferenciadas en una muestra a lo largo del tiempo.
  - 60 En una realización, la determinación del nivel de células madre de cáncer en la muestra comprende la detección de uno o más biomarcadores asociados con células madre de cáncer y/o uno o más biomarcadores asociados con células diferenciadas. Opcionalmente, el nivel de células madre de cáncer en una muestra se puede determinar usando estudios de xenotrasplante como se conoce en la técnica.
  - 65 En una realización, los métodos descritos en la presente memoria incluyen determinar el nivel de células madre de cáncer en una muestra probando la muestra para la expresión de biomarcadores asociados con células de células

madre de cáncer y/o células diferenciadas. En una realización, los biomarcadores asociados con células madre de cáncer se seleccionan entre el receptor de dopamina (DR) 1+, DR2+, DR3+, DR4+, DR5+, CD14+, CD34+ y CD44+. En una realización, los biomarcadores asociados con células diferenciadas se seleccionan entre CD11b+ y CD24+, CD114+ y CD16+.

5 En una realización, la muestra comprende células leucémicas o células sospechosas de ser células leucémicas y la determinación del nivel de células madre de cáncer incluye pruebas para uno o más receptores de dopamina y CD14, en donde las células que expresan uno o más receptores de dopamina y CD14 (DR+, CD14+) se identifican como células madre de cáncer leucémico. En una realización, la muestra comprende células leucémicas o células  
10 sospechosas de ser células leucémicas y la determinación de la presencia o ausencia de células madre de cáncer incluye pruebas para uno o más receptores de dopamina y CD14+ y opcionalmente CD34+.

15 En una realización, la muestra comprende células de cáncer de mama o células sospechosas de ser células de cáncer de mama y determinar el nivel de células madre de cáncer de mama comprende ensayar la muestra para la expresión de CD44 y la ausencia de expresión de CD24 (CD44+/CD24- o CD44+/CD24<sub>bajo</sub>). En una realización, la determinación del nivel de células madre de cáncer de mama comprende ensayar la muestra para la expresión de uno o más receptores de dopamina seleccionados de DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5 y opcionalmente CD44 y CD24 (DR+/ CD44+/CD24- o bajo). En una realización, la determinación del nivel de células madre de cáncer de mama  
20 comprende ensayar la muestra para la expresión de DR5 y opcionalmente CD44 y CD24. Los métodos descritos en el presente documento opcionalmente incluyen ensayar la muestra para detectar otros biomarcadores conocidos en la técnica que se asocian con células madre de cáncer o células diferenciadas.

25 En una realización, los compuestos tienen un coeficiente de similitud de Tanimoto con la tioridazina de al menos 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 0,95. Opcionalmente, los compuestos incluyen, pero no se limitan a, tioridazina, proclorperazina, trifluoperazina, flufenazina, perfenazina y triflupromazina. En una realización, los compuestos son derivados de fenotiazina. En una realización, el compuesto diferencia preferentemente células madre de cáncer en relación con células madre normales. En una realización, el cáncer es leucemia mieloide aguda.

30 Se ha determinado sorprendentemente que los antagonistas del receptor de dopamina tales como la tioridazina o la clorpromazina son citotóxicos para las células cancerosas y en particular la leucemia mieloide aguda (LMA). Además, se ha descubierto que los antagonistas de los receptores de dopamina a concentraciones tóxicas para las células cancerosas tienen un efecto relativamente limitado sobre las células madre normales, tales como las células madre hematopoyéticas. También se ha determinado que los receptores de dopamina se expresan en líneas  
35 celulares de LMA y en células de LMA primarias, pero muestran una expresión relativamente menor en líneas celulares enriquecidas para células madre hematopoyéticas normales. Además, la expresión de los receptores de dopamina en células de LMA se correlaciona con la del marcador monoblástico CD14. Los antagonistas del receptor de la dopamina tales como la tioridazina son citotóxicos para las células de LMA que expresan CD14.

40 En una realización, el antagonista del receptor de dopamina es un derivado de fenotiazina tal como tioridazina o clorpromazina. Opcionalmente, el antagonista del receptor de dopamina es un antagonista de múltiples receptores que antagoniza más de un receptor de dopamina. En una realización, el antagonista del receptor de dopamina es un antagonista del receptor de dopamina de la familia D<sub>2</sub>. En una realización, el antagonista de DR es un compuesto seleccionado de entre los enumerados en la Tabla 1.

45 También se divulga un método *in vitro* para reducir la proliferación de una célula cancerosa que comprende poner en contacto la célula cancerosa con un antagonista del receptor de dopamina. También se da a conocer el uso *in vitro* de un antagonista del receptor de dopamina para reducir la proliferación de una célula cancerosa. En un ejemplo, el contacto de la célula con un antagonista del receptor de dopamina *in vitro* induce la muerte celular o la diferenciación de una célula cancerosa o célula precancerosa. En un ejemplo, la célula cancerosa es una célula madre de cáncer y  
50 poner en contacto la célula madre de cáncer con un antagonista del receptor de dopamina *in vitro* induce la diferenciación de la célula madre de cáncer. En un ejemplo, la célula precancerosa es una célula mieloproliferativa. Opcionalmente, la célula cancerosa es una célula leucémica, tal como una célula de leucemia mieloide aguda (LMA) o una célula leucémica monocítica. En un ejemplo, la célula es CD14 positiva. En un ejemplo, el antagonista del receptor de dopamina es un derivado de fenotiazina tal como tioridazina. En un ejemplo, el antagonista de dopamina  
55 es un compuesto seleccionado de entre los enumerados en la Tabla 1.

También se divulgan métodos para identificar un sujeto con leucemia. En un ejemplo, los métodos incluyen determinar el nivel de expresión de uno o más receptores de dopamina en una muestra del sujeto y comparar el  
60 nivel de expresión de uno o más receptores de dopamina con un control. Opcionalmente, la muestra comprende glóbulos blancos y/o el método comprende además proporcionar una muestra que comprende glóbulos blancos del sujeto. En un ejemplo, el aumento de los niveles de expresión de uno o más receptores de dopamina en comparación con un control es indicativo de un sujeto con leucemia, tal como leucemia mieloide aguda o leucemia monocítica. En un ejemplo, el método comprende además ensayar CD14.

65 También se proporcionan métodos para cribar compuestos por actividad anticancerosa que comprende identificar compuestos que son antagonistas del receptor de dopamina. En una realización, la actividad anticancerosa es la

proliferación reducida de células LMA o células monocíticas. Opcionalmente, los métodos incluyen identificar compuestos que inducen preferentemente la diferenciación de células madre de cáncer con respecto a células madre hematopoyéticas o normales.

5 En un aspecto, se proporcionan métodos para identificar una célula madre de cáncer a partir de una población de células. En una realización, el método comprende determinar si una célula expresa uno o más biomarcadores seleccionados entre el receptor de dopamina (DR) 1, DR2, DR3, DR4 y DR5. En una realización, la expresión del receptor de dopamina (DR) 1, DR2, DR3, DR4 y/o DR5 es indicativa de que la célula es una célula madre de cáncer.

10 En una realización, la población de células comprende células aisladas de un mamífero o células en cultivo tales como un cultivo celular. En una realización, la población de células comprende células madre pluripotentes. En una realización, la población de células comprende células cancerosas tales como células cancerosas hematológicas o células precancerosas. Opcionalmente, el método incluye probar la célula para la expresión de polinucleótidos o polipéptidos que codifican para DR1, DR2, DR3, DR4 o DR5. En una realización, una célula que expresa DR1, DR2,  
15 DR3, DR4 y DR5 se identifica como una célula madre de cáncer. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen también aislar células madre de cáncer de una población de células. Por ejemplo, las células que se identifican como células madre de cáncer se pueden aislar de una población de células u otro material usando métodos conocidos en la técnica tales como citometría de flujo, clasificación celular activada por fluorescencia, separación por columna de afinidad o selección magnética. En una realización, las células madre de  
20 cáncer se aíslan utilizando anticuerpos para uno o más de DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5.

Otras características y ventajas de la presente descripción resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

25 Breve descripción de los dibujos

Se describirán ahora una o más realizaciones de la divulgación en relación con los dibujos en los que:

30 La Figura 1 muestra que la tioridazina a 10  $\mu\text{M}$  es citotóxica para las líneas celulares leucémicas HL-60, MV4-11 y OCI3.

La Figura 2 muestra que la tioridazina a 10  $\mu\text{M}$  tiene efectos limitados en el potencial de formación de colonias de CMH normales (2A) mientras que reduce significativamente el potencial de formación de blastocitos de LMA.

35 La Figura 3 muestra gránulos de células de colonias de UFC generadas a partir de CMH normal y LMA tratadas con tioridazina.

40 La Figura 4 muestra que tanto la clorpromazina 10  $\mu\text{M}$  como la tioridazina 10  $\mu\text{M}$  son citotóxicas para las líneas celulares leucémicas HL-60, MV4-11 y OCI3.

La Figura 5 muestra la expresión de los receptores de dopamina DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5. Se observó la expresión de DR en líneas celulares de LMA, algunas células de LMA primaria y las células mononucleares (MNC), pero no en células enriquecidas con CMH (línea de CB (-)).

45 La Figura 6 muestra que los antagonistas de DR múltiples son citotóxicos para las líneas celulares de LMA. SKF = clorhidrato de (R)-(+)-SKF-38393; 7OH = bromhidrato de R(+)-7-hidroxi-DPAT; GR = GR 103691; SCH = clorhidrato de R(+)-SCH-23390; CLOZ = clozapina; CHL = clorhidrato de clorpromazina; THIO = Tioridazina.

50 La Figura 7 muestra datos de FACS que muestran que los receptores de dopamina se expresan en la población de células CD14+ en LMA primaria.

La Figura 8 muestra que la tioridazina se dirige selectivamente y reduce la frecuencia normalizada de las células CD14+ en la LMA primaria.

55 La Figura 9 muestra la identificación de mefloquina y tioridazina usando el cribado químico para compuestos que diferencian CMPH neoplásico. (A) Esquema de la estrategia de cribado. (B) gráfico de dispersión XY del porcentaje de actividad residual (% de AR) de las señales de GFP y Hoechst del cribado del compuesto 590. La región esbozada demuestra la pérdida de pluripotencia (PDP) como se define por GFP y Hoechst reducidos. Cada punto n = 3, media +/- DE. (C) Resumen de las respuestas observadas con 590 compuestos. (D) Estructura química de los  
60 compuestos candidatos; tioridazina, azatioprina y mefloquina. (E) GFP representativo, Hoechst y las imágenes microscópicas fusionadas de células v1H9-Oct4-GFP tratadas con compuestos candidatos a 10  $\mu\text{M}$ . (F) Histograma de la intensidad de GFP de estas imágenes. (G) Curvas de respuesta a la dosis de v1H9-Oct4-GFP tratadas con compuestos candidatos y cálculo de CE<sub>50</sub>. Cada punto n = 3; media +/- EEM (error estándar de la media).

65 La Figura 10 muestra el efecto de la salinomicina, mefloquina y tioridazina en poblaciones normales y neoplásicas. (A-B) Análisis de citometría de flujo de la frecuencia de las células Oct4+ en células (A) H9 y (B) v1H9-Oct4-GFP

5 tratadas con salinomicina (SAL), mefloquina (MQ) y tioridazina (THIO) a  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M. Cada barra n = 3; media +/- DE. Los valores se normalizan a las muestras de control tratadas con DMSO; (-) medio DMSO, (-) media menos una DE, (-) nivel de %Oct4+ en muestras tratadas con BMP4. (C) Relación de células normalizadas %Oct4+ en H9 por v1H9-Oct-GFP con el mismo compuesto a la misma concentración. Porcentaje de tinción de CMPH neoplásicas positivas para (D) p53 y (E) p21 después de un tratamiento de 24 h con etopósido 10  $\mu$ M, tioridazina 10  $\mu$ M (THIO), y controles (CTRL) tratados con BMP4 y DMSO. Cada barra n = 3; media +/- DE. Se incluyeron imágenes representativas de células tratadas con etopósido y tioridazina. Las flechas muestran p53+ y p21+ en células tratadas con etopósido frente a células tratadas con tioridazina. (F) Genes asociados con la diferenciación con aumento de > 2 veces después de tratamiento con tioridazina de CMPH neoplásicas. Genes divididos en linajes respectivos, endodermo (ENDO), mesodermo (MESO), célula germinal (GERM), neural (NEURO) y trofoblasto (TROPH). Cada barra representa la media de dos experimentos separados. (G-K) Multilinaje hematopoyético y potencial clonogénico en respuesta al tratamiento con el compuesto detectado usando ensayos de metilcelulosa. Pellas representativas de unidades formadoras de colonias (UFC) de (G) células madre y progenitoras hematopoyéticas (CMPH) frente a (H) pellas de blastocitos de LMA después del tratamiento con el compuesto. (I-J) Cuantificación de las UFC respectivas y UFC de blastocitos generadas a partir de (I) CMPH y (J) células blastocitos de LMA después del tratamiento con el compuesto. Los valores se normalizaron a muestras de control tratadas con DMSO; (-) medio DMSO, (-) media menos un EEM. Cada barra de CMPH n = 7 muestras individuales, media +/- EEM. Cada barra de LMA al menos n = 5 muestras de pacientes individuales, media +/- EEM. (K) Relación de UFC de CMPH normalizadas por UFC de blastocitos de LMA con el mismo compuesto a la misma concentración. (L) Frecuencia de células granulocíticas CD11b normalizadas en células cultivadas de LMA del paciente tratadas con tioridazina 10  $\mu$ M (THIO 10  $\mu$ M) o vehículo DMSO (CTRL) durante un máximo de 96 horas. Cada barra n = 3, media +/- DE. (\*) p < 0,05, (\*\*) p < 0,01, (\*\*\*) p < 0,001, (\*\*\*\*) p < 0,0001.

25 La Figura 11 muestra el efecto de la salinomicina, mefloquina y tioridazina en CMPi y CMPH derivadas de fibroblastos. (A) Análisis de citometría de flujo de la frecuencia de células Oct4+ en CMPi derivadas de fibroblastos (CMi-Fib) tratadas con salinomicina (SAL), mefloquina (MQ) y tioridazina (THIO) a  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M. Cada barra n = 3; media +/- DE. Los valores se normalizan a las muestras de control tratadas con DMSO; (-) medio DMSO, (-) media menos una DE, (-) nivel de %Oct4+ en muestras tratadas con BMP4. (B) Respuesta prolongada a la dosis de compuestos sobre CMPH neoplásica. Cada punto media +/- EEM. (C) potencial de linaje hematopoyético de linaje de CB tratado con tioridazina. Unidades formadoras de colonias (UFC) de eritroblastos (UFC-E), macrófagos (UFC-M) y granulocitos (UFC-G) colonias generadas en ensayos de metilcelulosa. (D) Composición de UFC generada a partir de linaje de CB tratado con salinomicina, mefloquina y tioridazina. Porcentaje de la composición de UFC generada con tratamiento con salinomicina (SAL), mefloquina (MQ) y tioridazina (THIO) a 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. (\*) p < 0,05, (\*\*) p < 0,01.

35 La Figura 12 muestra el efecto de la tioridazina sobre el injerto de CMH y CML. (A) Frecuencia de células CD45+ humanas en la médula ósea tras tratamiento de las CMPH con tioridazina 10  $\mu$ M (THIO 10  $\mu$ M) o mefloquina 10  $\mu$ M (MQ 10  $\mu$ M). Valores normalizados a muestras de control (CTRL) de CMPH tratadas con DMSO. Se evaluaron un total de dos muestras de CMPH. Media +/- EEM. (B) Diagramas de citometría de flujo representativos de dispersión lateral (SSC) frente a marcadores mieloides (CD33) o linfoides (CD19) dentro de la población de hCD45+. 12(C) Frecuencia de blastocitos de LMA CD45+ CD33+ en la médula ósea (MO) después del tratamiento de LMA con tioridazina 10  $\mu$ M (THIO 10  $\mu$ M) o mefloquina 10  $\mu$ M (MQ 10  $\mu$ M). Valores normalizados a muestras de control (CTRL) de LMA tratadas con DMSO. Se evaluó un total de dos muestras de LMA. (D) Diagramas de flujo representativos de CD33 frente a CD45 en poblaciones de control (CTRL) tratadas con DMSO frente a las tratadas con tioridazina (THIO 10  $\mu$ M). (E) Relación del porcentaje normalizado de injerto de CMPH hCD45 por porcentaje normalizado de injerto de blastocitos de LMA CD45 CD33. (\*) p < 0,05.

50 La Figura 13 muestra la respuesta *in vivo* al tratamiento con fármacos. (A) Frecuencia normalizada de células CD45+ humanas en la médula ósea tras el tratamiento de CMPH con salinomicina 1  $\mu$ M (SAL 1  $\mu$ M) con respecto a muestras tratadas con DMSO (CTRL). Se evaluaron un total de dos muestras de CMPH. Media +/- EEM. (\*\*\*\*) p < 0,0001 (B) Efecto de la tioridazina en el trasplante esplénico de CMH y CML. (B, parte superior) Frecuencia de células CD45+ humanas en el bazo después del tratamiento de CMPH con tioridazina 10  $\mu$ M (THIO 10  $\mu$ M). Valores normalizados a muestras de control de CMPH tratadas con DMSO (CTRL). Se evaluaron un total de dos muestras de CMPH. Media +/- EEM. (B, parte inferior) Blastocitos CD45+ CD33 + en el bazo después de tratamiento con tioridazina 10  $\mu$ M (THIO 10  $\mu$ M) de LMA. Valores normalizados a muestras de control (CTRL) de LMA tratadas con DMSO. Se evaluaron un total de dos muestras de LMA. (C) Efecto de la tioridazina sobre la regeneración eritrocítica y megacariocítica. Composición de células sanguíneas humanas detectadas en el xenotrasplante de MO inyectado con CMPH tratado con tioridazina 10  $\mu$ M (THIO 10  $\mu$ M) o con DMSO (CTRL). Los glóbulos rojos (GR) se definen por la positividad de la glicoforina A y las plaquetas por CD41a. (D) Confirmación del injerto leucémico mieloide de xenotrasplantes con LMA. Citometría de flujo de dispersión lateral frente a CD19, un marcador de células linfoides. El número del recuadro representa la media +/- EEM. (E-F) Efecto de la tioridazina sobre la autorrenovación *in vivo* de CMH y CML. Los niveles de injerto de (E) células hCD45+ o (F) hCD45+CD33+ en MO de xenotrasplantes secundarios que recibieron igual número de células hCD45 explantadas a partir de (E) linaje de CB primario o (F) trasplantes primarios de LMA tratados con tioridazina (THIO 10  $\mu$ M) o control (CTRL) de DMSO. Cada barra n = 3 ratones, media +/- EEM.

La Figura 14 muestra los receptores de dopamina expresados en células madre neoplásicas. (A-B) Citometría de flujo de (A) células H9 normales y (B) H9-Oct4-GFP neoplásicas teñidas con SSEA3 y todos los cinco subtipos de receptores de dopamina (DR). Se muestra la expresión de DR en la fracción de SSEA3+. (C) Citometría de flujo de sangre del cordón umbilical desprovista de linaje (CMPH) teñida con CD34, CD38 y todos los cinco subtipos de DR. La expresión de DR se presenta en las poblaciones cerradas. (D) Citometría de flujo de 13 muestras de pacientes con LMA teñidas para todos los cinco DR junto con la clasificación FAB asociada. (E) Colocalización de DRD5 en tumor de mama humano primario triplemente negativo (ER-, PR- y HER2-) teñido con CD44 y CD24. (F) La frecuencia de CMC de mama triplemente negativa (CD44+CD24-<sup>bajo</sup>) dentro de la población de DRD3 y DRD5. Cada barra compuesta por 3 tumores de mama triplemente negativos primarios, media +/- EEM. (G-H) Frecuencia de blastocitos de LMA (CD33+CD45+) de muestras de pacientes que son también positivas para (G) DRD3 y (H) DRD5. Se evaluó un total de 8 muestras de pacientes con LMA para determinar el potencial de iniciación leucémica en receptores de xenotrasplante. La iniciación leucémica se definió como injerto humano > 0,1% de CD33+ hCD45+ en médula ósea de ratón. Se ensayaron cuatro muestras de LMA iniciadoras de leucemia en 22 ratones mientras que se ensayaron 4 muestras de LMA no iniciadoras en 17 ratones. Total, n = 8 muestras de LMA, media +/- EEM.

La Figura 15 (A-B) Citometría de flujo de la fracción de SSEA3+ en (A) CMPih derivadas de fibroblastos y (B) CMPih derivadas de sangre de cordón umbilical teñidas para todos los cinco receptores de dopamina. (C) Expresión de receptores de dopamina de poblaciones de sangre humana. La citometría de flujo de células mononucleares de sangre de cordón teñidas para (C) eritroides (glicoforina A), (C) megacariocitos (CD41a); (D) células T (CD3), (D) células B (CD19); (E) monocitos (CD14) y (E) granulocitos (CD15). La tinción de los cinco DR en las poblaciones cerradas se muestran como histogramas. (F) Resumen de la localización de DR en las poblaciones de sangre. (G) Citometría de flujo del paciente con LMA que muestra DR en poblaciones cerradas. (H) Expresión del receptor de la dopamina en tumores de mama humano triplemente negativos. Las CMC de mama se definen como CD44+CD24-<sup>bajo</sup> (Al-Hajj et al., 2003). La colocalización de cada DR dentro de la población de CD44 y CD24 se muestra para tres tumores de mama triplemente negativos (ER-, PR- y HER2-).

La Figura 16 muestra que la tioridazina inhibe la señalización del receptor de dopamina en la LMA. (A) Expresión de DR de las líneas celulares LMA-OCI2 y LMA-OCI3. (B) Recuentos celulares de células LMA-OCI2 y LMA-OCI3 tratadas con tres fármacos antagonistas de DR. Los valores se normalizan a las muestras de control tratadas con DMSO. Cada barra n = 3; media +/- DE. (C-D) Recuento de células viables (7AAD-, Hoechst +) de las mismas líneas celulares tratadas con (C) 7OH-DPAT, un agonista de la familia DR D2, o (D) SKF38393, un agonista de la familia DR D1, en condiciones libres de suero. Los valores se normalizan a las muestras de control tratadas con DMSO. Cada barra n = 3; media +/- DE.

La Figura 17 muestra un diagrama de dispersión de los recuentos de células frente a cambios en la pluripotencia de las células v1O4 tratadas con compuestos de bibliotecas químicas. En una realización ilustrativa, los compuestos en la caja punteada se identificaron con base en su capacidad para causar una pérdida de pluripotencia y una reducción moderada en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas. Por encima de esta caja están compuestos que no redujeron significativamente el recuento de células ni causaron una ganancia en pluripotencia. Los compuestos situados inmediatamente debajo de la caja punteada se consideraron posiblemente tóxicos debido a la magnitud de su efecto sobre el recuento de células, sin embargo, algunos de estos compuestos pueden ser útiles como agentes contra células madre de cáncer puesto que muchos agentes quimioterapéuticos actuales exhiben efectos tóxicos similares. La tioridazina está representada por la estrella negra en el círculo punteado mientras que los análogos de la tioridazina son las estrellas negras en la caja punteada. La clorpromazina se identifica como la estrella negra en el círculo de color negro. Los análogos de tioridazina (compuestos con estructura similar a tioridazina) están representados desproporcionadamente al causar una pérdida relativa en el recuento de células y una pérdida de pluripotencia en variantes de células madre neoplásicas.

La Figura 18 es un gráfico que muestra la inducción de apoptosis (con base en la reducción en el porcentaje de núcleos normales presentes) después del tratamiento de las líneas celulares de cáncer LMA, LMA-OCI2 y LMA-OCI3, con los compuestos identificados de la Figura 17 (puntos grises). Los signos de apoptosis aumentan hacia el origen. Los puntos negros se refieren a tioridazina y análogos de tioridazina. La tioridazina induce la muerte celular en líneas celulares de cáncer de LMA, pero los análogos de tioridazina son inactivos. Los análogos de tioridazina con actividad contra variantes de células madre neoplásicas (células v1O4) no inducen la muerte celular en líneas celulares de cáncer de LMA.

La Figura 19 muestra que las variantes de células madre neoplásicas (células v1O4) tratadas con tioridazina muestran menos signos de estrés/muerte celular que las células tratadas con tiostreptona, como un control que se sabe que induce la apoptosis. Imágenes microscópicas de células v1O4 tratadas con compuestos a 10 μM después del tratamiento de 3 días y teñidas con tinción nuclear Hoechst. Se sabe que la tiostreptona induce apoptosis y la citarabina es un agente quimioterapéutico conocido para el tratamiento de la LMA. La hinchazón y la condensación del núcleo son señales de estrés celular o inducción de la muerte celular.

La Figura 20 muestra que el cribado con variantes de células madre neoplásicas (células v1O4) identifica un pequeño subconjunto de compuestos anticancerígenos que son también activos contra células madre de cáncer (CMC). Todos los compuestos terapéuticos anticancerígenos conocidos/actuales se identificaron a partir de nuestras

bibliotecas químicas combinadas (NIH, PWK, TOCRIS, CCC: 167 en total) y se graficaron contra el recuento de células y PDP. Sólo el 5% de los compuestos anticancerígenos conocidos se identificaron también como compuestos contra células madre de cáncer que causaron una pérdida de pluripotencia y reducciones moderadas en los recuentos celulares de variantes de células madre neoplásicas. Por lo tanto, los compuestos anticancerígenos que son también agentes contra células madre de cáncer son por lo tanto sorprendentemente poco frecuentes.

La Figura 21 muestra para fines ilustrativos el flujo de trabajo para un proceso de dos etapas para identificar y validar compuestos que selectivamente se dirigen a células madre de cáncer, pero no a células madre normales. Se usan los valores de CE50 de curvas de respuesta a la dosis de variantes de células madre neoplásicas (células v1O4) y de células madre normales (células H9) para calcular la relación de potencia de actividad selectiva para cada compuesto.

La Figura 22 muestra, con fines ilustrativos, la determinación de la duración óptima y la densidad de siembra inicial para células madre normales (células H9) y células v1O4 para su uso con un análisis de alto contenido para determinar la pérdida de pluripotencia y el recuento de células. Ai Determinación de la siembra 6 días después como punto de tiempo óptimo en H9. Aii Determinación de 10K como óptima para la densidad de siembra para H9. Determinación de la siembra 4 días después como punto de tiempo óptimo basado en un intervalo de densidades de siembra de células v1O4 para la tinción Hoechst (Bi) y la señal GFP (Bii). Determinación de la densidad de siembra de células v1O4 5K como óptima para la tinción Hoechst (Ci) y la señal GFP (Cii). Las células H9 y v1O4 se sembraron en placas de 96 pozos y se trataron +/- BMP4 (0,1% de DMSO) un día después de la siembra. La respuesta de PDP para v1O4 se cuantificó 4 días después de la siembra utilizando fluorometría de placa y se cuantificaron los recuentos de células para H9 mediante análisis de alto contenido.

La Figura 23 muestra un gráfico de barras que identifica compuestos con las relaciones de selectividad-actividad más altas para células madre de cáncer (células v1O4).

La Figura 24A muestra curvas de respuesta a la dosis de compuestos de actividad selectiva que muestran selectividad frente a variantes de células madre neoplásicas a 10  $\mu$ M. La Figura 24B muestra curvas de respuesta a la dosis de compuestos de actividad selectiva que no presentan necesariamente selectividad a 10  $\mu$ M, pero son sin embargo selectivos a otras concentraciones. Los recuentos de células se normalizan a los controles no tratados. La línea de trazos es de una concentración de 10  $\mu$ M. Por lo tanto, los compuestos de cribado a una pluralidad de concentraciones de prueba son útiles para identificar compuestos que son selectivos para agentes anticancerígenos.

La Figura 25 muestra, con fines ilustrativos, un gráfico del porcentaje de células v1O4 o H9 que tiñen positivamente para p53 después del tratamiento con los compuestos de alta actividad selectiva (gris) identificados en la Figura 23. Los niveles altos de p53 indican la activación de la respuesta al estrés dependiente de p53. Los puntos negros representan los niveles de p53 de células v1O4 y H9 tratadas con tioridazina y compuestos de tipo estructura tio. Los compuestos de alta selectividad tienen grados variables de actividad de activación de la respuesta al estrés p53. Los análogos de tioridazina mostrados en la Figura 25 por tener poca o ninguna activación de respuesta al estrés p53 incluyen triflupromazina, proclorperazina, trifluoperazina, flufenazina y perfenazina.

La Figura 26 muestra que la tioridazina se dirige selectivamente a células madre de cáncer que expresan receptores de dopamina. La Figura 26A muestra que la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 está altamente enriquecida por células madre de cáncer (CMC). La citometría de flujo mostró que el 99% de las células MDA-MB-231 exhibían el fenotipo de antígeno de CMC de mama CD44+CD24+/bajo. La Figura 26B muestra histogramas que revelan que las células MDA-MB-231 también expresan diversos receptores de dopamina. La Figura 26C muestra que el tratamiento con tioridazina de células MDA-MB-231 reduce la población de células que expresan el receptor de dopamina D1, DRD1 (también conocido como DR1). Las células se trataron durante 3 días con tioridazina 10  $\mu$ M. La Figura 26D muestra que el tratamiento con tioridazina de células MDA-MB-231 aumenta la expresión total de CD24. El tratamiento con tioridazina también dio como resultado disminuciones en el número de células totales en comparación con las células no tratadas (datos no mostrados).

La Figura 27 muestra un diagrama de dispersión de compuestos identificados y validados como agentes selectivos contra células madre de cáncer usando un ejemplo de realización del método de cribado en dos etapas descrito en la presente memoria. En la primera etapa, se trataron variantes de células madre neoplásicas (células V104) con compuestos de una biblioteca química. Los compuestos que indujeron una pérdida de pluripotencia y una reducción en el recuento de células más allá de un umbral predeterminado (indicado por la línea discontinua en la Figura 27) se clasificaron como agentes de prueba. En la segunda etapa, se ensayaron una serie de diluciones de agentes de prueba en variantes de células madre neoplásicas y células madre humanas normales para generar curvas de respuesta a la dosis. Se calcularon los valores CE50 de las curvas de respuesta a la dosis de cada línea celular y los compuestos que mostraron una diferencia mayor de tres veces en el valor CE50 de las células madre normales frente a las variantes de células madre neoplásicas se identificaron como agentes selectivos contra células madre de cáncer (mostrados como estrellas negras en la Figura 27).

Descripción detallada

## I. Definiciones

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a uno de un grupo de enfermedades causado por el crecimiento anormal no controlado de células que pueden propagarse a tejidos adyacentes u otras partes del cuerpo. Las células cancerosas pueden formar un tumor sólido, en el que las células cancerosas se juntan o existen como células dispersas, como en la leucemia.

10 El término "célula cancerosa" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una célula caracterizada por crecimiento anormal no controlado y la capacidad de invadir otro tejido o una célula derivada de tal célula. Una célula cancerosa incluye, por ejemplo, una célula cancerosa primaria obtenida de un paciente con cáncer o línea celular derivada de dicha célula. De forma similar, una "célula cancerosa hematológica" se refiere a una célula cancerosa derivada de una célula sanguínea o de la médula ósea. Ejemplos de células cancerosas incluyen, pero no se limitan a, células madre de cáncer, células de cáncer de mama, células de cáncer de recto, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata y células de cáncer hematológicas tales como mielomas, células leucémicas o células de linfoma.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "célula madre de cáncer" se refiere a una célula que es capaz de autorrenovarse y diferenciarse en los linajes de células cancerosas que comprenden un tumor sólido y/o neoplasia hematológica. Las células madre de cáncer son únicamente capaces de iniciar y mantener la enfermedad. Las variantes de células madre neoplásicas son células pluripotentes que presentan las propiedades de las células madre de cáncer y son útiles en los métodos de cribado descritos en la presente memoria para identificar y/o validar agentes contra células madre de cáncer.

25 Tal como se usa en la presente memoria, "biomarcador asociado con células madre de cáncer" se refiere a un biomarcador tal como un ácido nucleico, un polipéptido o un fragmento del mismo, cuya expresión, o falta de él, por una célula es indicativa de que la célula es una célula madre cancerosa. Por ejemplo, en una realización la expresión de uno o más receptores de dopamina (DR+) y CD14 (CD14+) es indicativa de que una célula es una célula madre de cáncer leucémico. En una realización, una célula que no expresa CD24 (CD24-) o expresa niveles bajos de CD24 (CD24<sub>bajo</sub>) y expresa CD44 (CD44+) es indicativa de que la célula es una célula madre de cáncer de mama.

35 Tal como se usa en la presente memoria, "biomarcador asociado con células diferenciadas" se refiere a un biomarcador tal como un ácido nucleico, un polipéptido o un fragmento del mismo, cuya expresión, o falta de la misma, por una célula es indicativa de que la célula está en un estado diferenciado y no una célula madre tal como una célula madre normal o una célula madre de cáncer. Por ejemplo, en una realización la expresión de CD11b (CD11b+) es indicativa de que la célula está en un estado diferenciado y no en una célula madre de cáncer.

40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "variante de célula madre neoplásica" se refiere a una célula que es capaz de diferenciarse en más de un tipo de célula y no requiere Oct4 para autorrenovación o supervivencia. Las variantes de células madre neoplásicas se distinguen fácilmente de las células madre normales. Por ejemplo, algunas variantes de células madre neoplásicas coexpresan FGFR1 e IGF1R. Por el contrario, las células madre embrionarias humanas normales (CMEh) expresan IGF1R, mientras que FGFR1 se expresa exclusivamente en células tipo fibroblastos también encontradas en los cultivos de células madre embrionarias humanas. Algunas variantes de células madre neoplásicas no requieren factor básico de crecimiento de fibroblastos (FbCF) en cultivo para el mantenimiento de un estado no diferenciado. Como se usa en la presente memoria, un "estado no diferenciado" se refiere a una célula que es pluripotente o que todavía es capaz de diferenciarse en más de un tipo de célula. Algunas variantes de células madre neoplásicas mantienen la expresión de SSEA3 en ausencia de FbCF, y/o requieren Nanog para autorrenovación y supervivencia celular.

50 En un aspecto de la descripción, las variantes de células madre neoplásicas descritas en la presente memoria pueden ser pasadas como una sola célula. Como se usa en la presente memoria, "pasadas como células individuales" se refiere a aislar y transferir individualmente una única célula a un recipiente de cultivo en el que la célula es entonces capaz de formar una pluralidad de células. Opcionalmente, las variantes de células madre neoplásicas incluyen uno o más vectores o constructos informadores tales como un vector en el que la expresión de uno o más genes de pluripotencia está unida operativamente a un gen informador. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas tienen características neoplásicas y presentan un menor potencial de diferenciación *in vitro*. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas son nichos independientes y tienen mayor actividad de inicio del tumor. En particular, en una realización, las células madre neoplásicas presentan una diferenciación neural significativamente reducida y carecen de potencial hematopoyético. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "variantes de células madre neoplásicas" incluye células madre pluripotentes transformadas (CMPht) o células madre pluripotentes inducidas transformadas (CMPit) como se describe en la publicación PCT No. WO2011026222. Las variantes de células madre neoplásicas muestran similitudes en las propiedades funcionales con las células madre del cáncer somático y, por lo tanto, son útiles como sustituto de las células madre del cáncer somático. Las variantes de células madre neoplásicas también son susceptibles de alto contenido y alta producción de cribado *in vitro*. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas son variantes de células madre neoplásicas inducidas. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas

son variantes de células madre neoplásicas humanas. Opcionalmente, las variantes de células madre neoplásicas se derivan de una fuente somática o una fuente embrionaria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "célula madre normal" es una célula madre que no es una célula madre de cáncer o una variante de célula madre neoplásica. Opcionalmente, una "célula madre normal" es una célula madre que no exhibe las características de una célula cancerosa, como una variante de célula madre neoplásica. Ejemplos de células madre "normales" incluyen células madre pluripotentes, células madre embrionarias y células madre hematopoyéticas, células madre somáticas. Opcionalmente, las células madre normales son células madre humanas. Opcionalmente, las células madre normales se derivan de una fuente somática o una fuente embrionaria.

Tal como se usa en la presente memoria, "agente selectivo contra células madre de cáncer" se refiere a un agente que reduce la proliferación de células madre de cáncer en relación con las células madre normales. En algunas realizaciones, un "agente selectivo contra células madre de cáncer" provoca un aumento en la muerte celular y/o una pérdida de pluripotencia de células madre de cáncer en relación con las células madre normales. En una realización, un "agente selectivo contra células madre de cáncer" es un agente con un valor de concentración efectiva media (CE50) para una disminución en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas que es menor que el valor de CE50 para una disminución en el recuento de células de células madre normales. En una realización, se selecciona un compuesto como un "agente selectivo contra células madre de cáncer" si tiene un valor de CE50 para una disminución en el recuento de células de células madre normales que es al menos dos (2) veces el valor de CE50 para las variantes de células madre neoplásicas. En una realización, se selecciona un compuesto como un "agente selectivo contra células madre de cáncer" si tiene un valor de CE50 para una disminución en el recuento de células de células madre normales que es al menos tres (3) veces el valor de CE50 para las variantes de células madre neoplásicas.

El término "trastorno precanceroso" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a uno de un grupo de trastornos hiperproliferativos que pueden desarrollarse en cáncer, incluyendo por ejemplo trastornos precancerosos de la sangre, tales como enfermedad mieloproliferativa o síndrome mielodisplásico que es una condición premaligna que está relacionada con y/o puede convertirse en leucemia mieloide aguda (LMA).

El término "célula precancerosa" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula caracterizada por un crecimiento anormal no controlado o una célula derivada de dicha célula. El término "célula precancerosa" incluye, por ejemplo, una célula precancerosa primaria obtenida de un paciente con trastorno precanceroso o línea celular derivada de tal célula o de una célula madre de cáncer. De forma similar, una "célula precancerosa hematológica" se refiere a una célula precancerosa derivada de una célula sanguínea o de médula ósea. En una realización, la célula precancerosa hematológica es una célula mieloproliferativa.

El término "leucemia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier enfermedad que implique la proliferación progresiva de leucocitos anormales encontrados en tejidos hemopoyéticos, otros órganos y usualmente en la sangre en un número aumentado. "Células leucémicas" se refiere a leucocitos caracterizados por una proliferación aumentada anormal de células. Las células leucémicas pueden obtenerse de un sujeto diagnosticado con leucemia.

El término "leucemia mieloide aguda" o "leucemia mielógena aguda" ("LMA") se refiere a un cáncer de la línea mieloide de células sanguíneas, caracterizado por el rápido crecimiento de glóbulos blancos anormales que se acumulan en la médula ósea e interfieren con la producción de células sanguíneas normales. Las condiciones preleucémicas tales como los síndromes mielodisplásicos o mieloproliferativos también pueden desarrollarse en LMA.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "leucemia monocítica" se refiere a un subtipo de leucemia caracterizado por la expresión de CD14, e incluye la leucemia monocítica aguda, que es un subtipo de leucemia mieloide aguda. En una realización, se identifica un sujeto que tiene leucemia monocítica aguda si tienen más de un 20% de blastocitos en la médula ósea, y de éstos, más del 80% pertenecen al linaje monocítico.

El término "antagonista del receptor de dopamina" se refiere a un compuesto que produce cualquier reducción detectable o mensurable en la función o actividad de uno o más receptores de dopamina. En una realización, los receptores de dopamina (DR) se seleccionan entre DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5. Los antagonistas del receptor de la dopamina pueden ser selectivos para uno o múltiples receptores de dopamina, es decir, un "antagonista multirreceptor". Ejemplos de antagonistas de dopamina multirreceptores incluyen tioridazina y clorpromazina. Los receptores de dopamina se agrupan comúnmente en receptores de dopamina de la familia D1 (DR1 y DR5) y receptores de dopamina de la familia D2 (DR2, DR3 y DR4). En una realización, el antagonista del receptor de dopamina es un compuesto seleccionado de entre los enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1. Antagonistas de Dopamina adecuados para uso en los métodos de la presente memoria

Antagonista del receptor de dopamina	Mecanismo de acción
Sal de maleato de acetopromazina	Antagonista dopaminérgico



Amisulprida		Antagonista de los receptores D2 y D3
Amoxapina		Inhibidor de la recaptación de dopamina
Azaperona		Antagonista de los receptores dopaminérgicos
Benperidol		Antagonista de la dopamina
Benzo[a]fenantridina-10,11-diol, hexahidro-, trans- [CAS]	5,6,6a,7,8,12b-	Ligando D1
Promoprida		Antagonista de la dopamina
Bromperidol		Antagonista de la dopamina
Clorhidrato de clorpromazina		Antagonista de D2, D1, D3, D4 y D5 selectivos
Clorhidrato de clorprotixeno		Antagonista de D2 del receptor de la dopamina
Clorhidrato de clomipramina		derivado de clorpromazina
Disulfiram		Inhibidor de la beta-hidroxilasa de la dopamina
DO 897/99		Antagonista de D3
Domperidona		Antagonistas de la dopamina
DROPERIDOL		Antagonista de D2 (receptor de dopamina)
Clorhidrato de etopropazina		Derivado de tioridazina
Fluperlapina		Antagonista de D2 (receptor de dopamina)
Diclorhidrato de flufenazina		Antagonista de dopamina, antagonista de D1 & D2
Diclorhidrato de GBR 12909		Inhibidor de la recaptación de dopamina
Haloperidol		Antagonista de la dopamina D2, antagonista no selectivo
Clorhidrato de hidrastinina		Bloqueador del receptor de la dopamina
Indatralina		antagonista potente D
Itoprida		Receptores D2 de dopamina e inhibición de la ECA
LEVOSULPIRIDA		Antagonista de D2, D3 & D4
Succinato de loxapina		Antagonista de la dopamina/D2, D4
Mesoridazina		Antagonista de D2
Besvalato de mesoridazina		Antagonista de D
Sal de maleato de metotrimeprazina		Derivado de tioridazina
Clorhidrato de metixeno		Derivado de tioridazina
Clorhidrato de molindona		Antagonista del receptor de la dopamina
Nafadotrida		Antagonista de D3
Maleato de nomifensina		Inhibidor de la captación de dopamina
OLANZAPINA		Antagonista de D1 & D2
PEROSPIRONE HCl		Antagonista D2 & D4
Perfenazina		Antagonista D1 & D2
FENOTIAZINA		Derivado de tioridazina
Pimozida		Antagonista de la dopamina
Piperacetazina		Derivado de tioridazina
Proclorperazina		Derivado de tioridazina
Dimaleato de proclorperazina		Antagonista de la dopamina
Clorhidrato de promazina		Antagonista del receptor de la dopamina
Clorhidrato de prometazina		Derivado de tioridazina
Quetiapina		antagonista de los receptores de serotonina y dopamina
HEMIFUMARATO DE QUETIAPINA		Antagonista de D2
Clorhidrato de R(+)-SCH-23390		Antagonista de D1
Racloprida		Antagonista de D2
Clorhidrato de Remoxiprida		Antagonista dopaminérgico
RISPERIDONA		Antagonista de D1 & D2
Clorhidrato de S(-)eticloprida		Antagonista del receptor de la dopamina
Sertindol		Antagonista del receptor de dopamina D2/ serotonina 5-HT2
SKF 83566		Antagonista de D1
Spiperona		Antagonista de D2
Sulpirida		Antagonista de D2
Sulpirida		Antagonista de D2 & D3
Malato de tietilperazina		Derivado de tioridazina
Dimesilato de tioproperazina		Antagonista de D1 & D2
Clorhidrato de tioridazina		Derivado de tioridazina
Diclorhidrato de triflupromazina		Antagonista de D2
Clorhidrato de Triflupromazina		Antagonista de D1 & D2
Tartrato de trimeprazina		Derivado de tioridazina
Clorhidrato de trimetobenzamida		Antagonista de D2

Clorhidrato de ziprasidona	Antagonista de dopamina D2/ serotonina 5-HT2
Zotepina	Antagonista de dopamina D2/serotonina 5-HT2

Como se usa en la presente memoria, el término "fenotiazina" o "derivado de fenotiazina" se refiere a un compuesto que se deriva o contiene una fracción o estructura principal de fenotiazina. La fenotiazina tiene la fórmula  $S(C_6H_4)_2NH$  y los derivados de fenotiazina comprenden una o más sustituciones o adiciones a la fenotiazina. Por ejemplo, algunos derivados de fenotiazina tienen una estructura de tres anillos en la que dos anillos de benceno están unidos por un nitrógeno y un azufre. Ejemplos de derivados de fenotiazina incluyen tioridazina, clorpromazina, levomepromazina, mesoridazina, flufenazina, perfenazina, proclorperazina y trifluoperazina. Ejemplos adicionales de derivados de fenotiazina para uso en los métodos de la presente descripción se exponen en la Tabla 1. En una realización, la tioridazina tiene el nombre IUPAC 10-{2-[(RS)-1-Metilpiperidin-2-il]etil}-2-metilsulfanilfenotiazina. Opcionalmente, se usan una o más formas racémicas de un derivado de fenotiazina tal como tioridazina en los métodos descritos en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente memoria, "reducir la proliferación de una célula cancerosa" se refiere a una reducción en el número de células que surgen de una célula cancerosa como resultado del crecimiento celular o división celular e incluye la muerte celular o la diferenciación de una célula madre de cáncer. El término "muerte celular" tal como se utiliza en la presente memoria incluye todas las formas de muerte celular incluyendo necrosis y apoptosis. Tal como se usa en el presente documento, la "diferenciación de una célula madre de cáncer" se refiere al proceso mediante el cual una célula madre de cáncer pierde la capacidad de autorrenovarse y provocar los linajes de células cancerosas que comprenden un tumor o una neoplasia maligna hematológica. Como se usa aquí, "matar una célula madre de cáncer" incluye todas las formas de muerte celular incluyendo necrosis y apoptosis.

El término "determinar un pronóstico" se refiere a una predicción del progreso y/o resultado probable de una enfermedad, que opcionalmente incluye resultados definidos (tales como recuperación, síntomas, características, duración, recurrencia, complicaciones, muertes y/o tasas de supervivencia).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "control" se refiere a una muestra comparativa o a un valor predeterminado. En una realización, "control" se refiere a un nivel de expresión de un biomarcador como se describe en la presente memoria. En una realización, el control es representativo de células, tejidos o sangre normales, libres de enfermedad. En una realización, el control es representativo de sujetos con cáncer para los cuales se conoce el resultado clínico o la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, en una realización el "control" es representativo de sujetos que han sobrevivido durante al menos 5 años después de un diagnóstico con LMA. En una realización, el "control" es representativo de sujetos con cáncer que tienen una etapa particular del grado de la enfermedad. En una realización, el "control" es representativo de células madre que no son células madre de cáncer. En algunas realizaciones, el término "control" se refiere a una muestra de un sujeto tomada en un momento de tiempo anterior.

El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente memoria incluye todos los miembros del reino animal incluyendo mamíferos, y se refiere adecuadamente a seres humanos. Opcionalmente, el término "sujeto" incluye mamíferos que han sido diagnosticados con cáncer o están en remisión.

## 40 II. Métodos y usos

Se ha encontrado sorprendentemente que los antagonistas del receptor de dopamina (DR) son citotóxicos para las líneas LMA y las LMA primarias, siendo al mismo tiempo mucho menos tóxicos para las células madre hematopoyéticas normales. Como se muestra en los Ejemplos 2 y 10, el antagonista de DR tioridazina redujo significativamente la función de células madre leucémicas (CML) mientras se preservaba la capacidad de células madre hematopoyéticas normales.

En una realización, los antagonistas del receptor de dopamina son antagonistas para uno o más de los receptores de dopamina (DR) tales como DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5. Opcionalmente, el antagonista de DR es un antagonista de múltiples receptores, o es específico para un solo subtipo de receptor de dopamina. En una realización, el antagonista de DR es un derivado de fenotiazina tal como tioridazina, o clorpromazina. En una realización, el antagonista de DR se selecciona entre los compuestos enumerados en la Tabla 1.

En una realización, los métodos o usos descritos en la presente invención implican un derivado de fenotiazina tal como tioridazina o clorpromazina. Un experto en la técnica fácilmente podría identificar derivados adicionales de fenotiazina que son antagonistas del receptor de dopamina. En una realización, los derivados de fenotiazina tienen una toxicidad diferencial para células cancerosas, tales como células leucémicas, en comparación con células madre normales o células madre hematopoyéticas.

Un método *in vitro* para reducir la proliferación de una célula o células cancerosas que comprende poner en contacto la célula con un antagonista del receptor de dopamina. También se describe el uso *in vitro* de un antagonista del receptor de dopamina para reducir la proliferación de una célula o células cancerosas. En un ejemplo, la célula cancerosa es una célula madre de cáncer. En un ejemplo, el antagonista de DR induce la diferenciación o muerte

celular de una célula madre de cáncer. En un ejemplo, el antagonista de DR induce la muerte celular de una célula cancerosa. La célula cancerosa puede ser una célula precancerosa tal como una célula mielodiplásica o mieloproliferativa. En un ejemplo, la célula cancerosa es una célula cancerosa hematológica. En un ejemplo, la célula cancerosa es una célula leucémica, tal como una célula de un sujeto con LMA. En un ejemplo, el antagonista del receptor de DR es un derivado de fenotiazina tal como tioridazina o clorpromazina. En un ejemplo, el antagonista de DR se selecciona entre los compuestos enumerados en la Tabla 1.

Como se muestra en el Ejemplo 4 y la Figura 5, los solicitantes han mostrado sorprendentemente que algunas líneas celulares de LMA y células de LMA primarias presentan un aumento relativo en la expresión de receptores de dopamina en comparación con las células madre hematopoyéticas normales. Por lo tanto, la selección de sujetos con cáncer para la expresión de receptores de dopamina en células cancerosas puede servir para identificar sujetos que se beneficiarían del tratamiento con antagonistas del receptor de dopamina.

Se ha observado la expresión de receptores de dopamina en muestras de cáncer de mama y LMA y puede servir como un biomarcador para la gravedad de la enfermedad. Como se muestra en el Ejemplo 11 y en las Figuras 14g-h, los altos niveles de expresión de DR se correlacionan con un mal pronóstico mientras que los niveles bajos muestran un mejor pronóstico.

Como se muestra en el Ejemplo 11, la expresión del receptor de dopamina demarca células madre de cáncer humano de otras células tales como CMPH normales que expresan el marcador pluripotente SSEA3. Por consiguiente, en una realización, se proporciona un método para identificar una célula madre de cáncer a partir de una población de células que comprende determinar si una célula expresa uno o más biomarcadores seleccionados entre el receptor de dopamina (DR) 1, DR2, DR3, DR4 y DR5. En una realización, la expresión de DR1, DR2, DR3, DR4 o DR5 es indicativa de que la célula es una célula madre de cáncer. Opcionalmente, la expresión de 2 o más, 3 o más, 4 o más o todos los 5 DR es indicativa de que la célula es una célula madre de cáncer. En una realización, una célula que expresa DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5 se identifica como una célula madre de cáncer.

En una realización, la célula madre de cáncer se identifica a partir de una población de células. En una realización, la población de células contiene más de un tipo de células, tales como células somáticas, células madre pluripotentes, células cancerosas y/o células madre de cáncer. En una realización, la población de células es una pluralidad de células en cultivo celular, tal como cultivo de tejido. En una realización, la población de células es de un mamífero, tal como una muestra de tejido primario o una muestra de sangre. En una realización, la población de células es de un mamífero con cáncer o que se sospecha que tiene cáncer. En una realización, la población de células incluye células madre, células madre somáticas y/o células madre pluripotentes, así como una o más células madre de cáncer. En una realización, la población de células incluye células cancerosas o células precancerosas tales como células cancerosas hematológicas. En una realización, la población de células incluye células monocíticas. En una realización, la población de células incluye células de cáncer de mama. Opcionalmente, la población de células es de una muestra de tejido, tal como una muestra de tumor, que se ha disociado en células individuales.

En un aspecto del método, la etapa de determinar si la célula expresa uno o biomarcadores comprende probar la célula para la expresión de polinucleótidos o polipéptidos que codifican para DR1, DR2, DR3, DR4 o DR5. Por ejemplo, se pueden usar métodos conocidos en la técnica tales como RT-PCR o genes informadores que detectan la expresión de polinucleótidos, o métodos inmunohistoquímicos que detectan la expresión de polipéptidos, para determinar la expresión de un biomarcador tal como DR1, DR2, DR3, DR4 o DR5. En una realización, los biomarcadores son biomarcadores de la superficie celular y el método implica detectar DR1, DR2, DR3, DR4 o DR5 expresados en la superficie de la célula.

En una realización, los métodos para identificar una célula madre de cáncer o determinar un nivel de células madre de cáncer como se describe en la presente memoria incluyen determinar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores seleccionados entre el receptor de dopamina (DR) 1, DR2, DR3, DR4 y DR5 y luego comparar el nivel de expresión con un nivel de control. Por ejemplo, en una realización el control representa células que no son células madre de cáncer, tales como células madre somáticas, células madre hematopoyéticas o células que expresan el marcador de pluripotencia SSEA3, y células que tienen un mayor nivel de expresión de los biomarcadores DR1, DR2, DR3, DR4 y/o DR5 en comparación con el control se identifican como células madre de cáncer. Opcionalmente, las células que tienen una mayor cantidad de expresión en comparación con el control se identifican como células madre de cáncer (por ejemplo, al menos 2X, 5X o 10X, etc.).

En una realización, el método también puede comprender: (a) proporcionar una población de células (b) poner en contacto a la población con un agente que se une específicamente a uno o más biomarcadores seleccionados de DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5; y (c) seleccionar células que se unen específicamente al agente de (b), identificando así y/o aislando células madre de cáncer de una población de células. En una realización, el agente es un anticuerpo que se une selectivamente a un biomarcador. En una realización, los métodos descritos aquí pueden incluir opcionalmente dos o más etapas de selección o de aislamiento. Los métodos descritos aquí también pueden incluir una selección de etapa negativa, por ejemplo, excluyendo células que expresan uno o más marcadores expresados

en células que no son células madre de cáncer, o excluyendo células que muestran niveles reducidos de expresión de un marcador particular.

En una realización, la presente descripción incluye aislar células madre de cáncer de una población de células. Por ejemplo, en una realización, las células que se identifican como células madre de cáncer se aíslan de células que no son células madre de cáncer o de otros materiales en una muestra seleccionando o aislando células que expresan uno o más biomarcadores seleccionados de DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5. Opcionalmente, las células madre de cáncer se aíslan o seleccionan usando métodos conocidos en la técnica para clasificar células basándose en la expresión de uno o más biomarcadores. Por ejemplo, en una realización, la etapa de aislar las células madre de cáncer de la población de células comprende citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia, panoramización, separación por columna de afinidad o selección magnética. En una realización, las células que expresan uno o más receptores de dopamina se aíslan utilizando un agente de unión que se une selectivamente a receptores de dopamina que está conjugado con un soporte tal como el matric en una columna de separación o perlas magnéticas. En una realización, los métodos incluyen determinar el nivel de células madre de cáncer en una muestra mediante la detección de uno o más biomarcadores asociados con células madre de cáncer y/o uno o más biomarcadores asociados con células diferenciadas como se describe en la presente memoria.

En un aspecto de la descripción, los métodos descritos aquí incluyen determinar el nivel de uno o más biomarcadores en una muestra de un sujeto, tal como el nivel de uno o más receptores de dopamina. En una realización, la muestra comprende células cancerosas o se sospecha que comprende células cancerosas o células precancerosas. Por ejemplo, la muestra puede comprender una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de sangre periférica, una muestra de sangre fraccionada, una muestra de médula ósea, una biopsia, una muestra de tejido congelada, una muestra de tejido fresco, una muestra celular y/o una sección incrustada en parafina. En una realización, el sujeto tiene o se sospecha que tiene LMA y la muestra comprende células mononucleares. En ciertas realizaciones, la muestra se procesa antes de detectar el nivel de biomarcador. Por ejemplo, una muestra puede fraccionarse (por ejemplo, por centrifugación o usar una columna para exclusión por tamaño o por FACS usando un biomarcador para monocitos), concentrarse o procesarse, dependiendo del método de determinación del nivel de biomarcador empleado.

El nivel de expresión de los biomarcadores descritos en la presente memoria se puede determinar por métodos conocidos comúnmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, en una realización, el nivel de uno o más biomarcadores se determina midiendo o detectando el nivel de un ácido nucleico tal como ARNm, o el nivel de una proteína o polipéptido. En una realización, la expresión de uno o más biomarcadores se determina detectando la expresión en la superficie celular de DR1, DR2, DR3, DR4 y/o DR5. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria incluyen la detección de un biomarcador usando inmunohistoquímica, tal como utilizando anticuerpos específicos para el biomarcador u otro agente de detección específico de biomarcador. Ejemplos de anticuerpos del receptor de dopamina adecuados para su uso en los métodos descritos aquí se enumeran también en el Ejemplo 7 de la presente descripción.

En una realización, el nivel de un ARNm que codifica para un biomarcador se determina mediante PCR cuantitativa tal como RT-PCR, análisis en serie de la expresión génica (SAGE), uso de un microarreglo, tecnología digital de códigos de barras o transferencia de Northern. Un experto en la técnica apreciará que se pueden usar varios métodos para determinar el nivel de un biomarcador, incluyendo enfoques de espectrometría de masas, tales como control de reacción múltiple (CRM) y control de iones del producto (CIP), e incluyendo también métodos basados en anticuerpos tales como inmunoensayos tales como transferencias de Western y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). En ciertas realizaciones, la etapa de determinar la expresión de un biomarcador tal como uno o más receptores de dopamina como se describe en la presente memoria, comprende el uso de inmunohistoquímica y/o un inmunoensayo. En ciertas realizaciones, el inmunoensayo es un ELISA. En aún otra realización, el ELISA es un ELISA tipo sándwich.

El término "nivel" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad (por ejemplo, cantidad relativa o concentración) de un biomarcador o tipo celular que es detectable o medible en una muestra. Por ejemplo, el nivel puede ser una concentración tal como  $\mu\text{g/L}$  o una cantidad relativa tal como 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80 y/o 100 veces o más a un nivel de control, estándar o nivel de referencia. Opcionalmente, un control es un nivel tal como el nivel medio o mediano en una muestra de control. El nivel de biomarcador puede ser, por ejemplo, el nivel de proteína, o de un ARNm que codifica para el biomarcador tal como un receptor de dopamina.

En una realización, cuando se determina el nivel de dos o más biomarcadores, se pueden usar los niveles de los dos o más biomarcadores para generar un perfil de expresión para el sujeto. Por ejemplo, en una realización, los métodos descritos aquí incluyen determinar un nivel para dos o más biomarcadores en la muestra, generar un perfil de expresión basado en el nivel de los dos o más biomarcadores y comparar el perfil de expresión con un perfil de expresión de control. A continuación, se utiliza una diferencia o similitud en el perfil de expresión de la muestra de prueba y el perfil de expresión de control para determinar un nivel de células madre de cáncer en una muestra, proporcionar un pronóstico para el sujeto de prueba, identificar el sujeto que tiene cáncer o indicar si el sujeto es adecuado para el tratamiento con un antagonista del receptor de dopamina.

Un aspecto adicional de la descripción incluye métodos de cribado de compuestos para actividad anticancerosa que comprende identificar compuestos que antagonizan uno o más receptores de dopamina. En una realización, los compuestos que antagonizan los receptores de dopamina se identifican por tener actividad anticancerígena. En una realización, los métodos incluyen cribado de compuestos para identificar aquellos que reducen la proliferación de células madre de cáncer en relación con células madre normales, tales como células madre hematopoyéticas como se expone en los Ejemplos 7 y 8 de la presente descripción.

La presente descripción también proporciona métodos para identificar y validar un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer. En una realización, el método comprende:

i) poner en contacto una o más variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba y una o más células madre normales con el agente de prueba;

ii) detectar un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba, y detectar un cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al agente de prueba; y

iii) identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el contacto con el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales,

en donde el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba y se detecta el cambio en el recuento de células para las células madre normales entre aproximadamente 4 días y 6 días después de contactar las células con la prueba agente.

Opcionalmente, los métodos descritos aquí incluyen agentes de cribado para seleccionar agentes de prueba que inducen pérdida de pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas antes de cribar los agentes de prueba para la actividad diferencial sobre el recuento de células de células madre normales y variantes de células madre neoplásicas. En una realización, el método incluye cribar uno o más agentes para identificar uno o más agentes de prueba que inducen pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas. Las realizaciones descritas en este documento también incluyen también un método de dos etapas para identificar y validar un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer. En una realización, el método comprende:

i) detectar un cambio en la pluripotencia y un cambio en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con el agente y seleccionar un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células de las variantes de las células madre neoplásicas; y

ii) poner en contacto una o más variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba y poner en contacto una o más células madre normales con el agente de prueba, detectar un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba, detectar un cambio en el recuento de células madre normales en respuesta al agente de prueba e identificación del agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales.

Los agentes de cribado para seleccionar agentes de prueba que inducen pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas antes del cribado para actividad diferencial con respecto al efecto de los agentes de prueba sobre células madre normales y variantes de células madre neoplásicas proporciona una serie de ventajas. El cribado de los agentes de prueba para la actividad diferencial utilizando células madre normales es tanto un recurso intensivo como consumidor de tiempo. El uso de un método de cribado en dos etapas permite un enfoque más específico para validar agentes como agentes selectivos contra células madre de cáncer. En particular, el cultivo de células madre normales es relativamente difícil comparado con el cultivo de células madre neoplásicas. El ensayo de aquellos agentes que inducen una pérdida de pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas para la actividad diferencial usando células madre normales minimiza los recursos y el tiempo que de otro modo serían necesarios para validar agentes contra células madre de cáncer.

Además, se ha determinado que los agentes de identificación que 1) inducen una pérdida de pluripotencia y reducen el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas e 2) inducen una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales, es particularmente eficaz para identificar y validar agentes contra células madre de cáncer que dirigen selectivamente la capacidad de autorrenovación de las células madre de cáncer.

En un aspecto de la descripción, se ha determinado que los agentes de prueba de cribado sobre variantes de células madre neoplásicas y células madre humanas normales en una pluralidad de concentraciones de prueba para cambios diferenciales en el recuento de células son útiles para la identificación y validación de agentes de prueba como agentes selectivos contra células madre de cáncer. Aunque muchos métodos de cribado de alto rendimiento sólo ensayan agentes para la actividad en una sola o en un pequeño número de concentraciones de prueba, algunos agentes selectivos contra células madre de cáncer no se identificarán fácilmente probando un agente para la actividad diferencial sobre el recuento de células a una sola o un pequeño número de concentraciones de prueba. Como se muestra en la Figura 24 y el Ejemplo 18, la 8-azaguanina y el parbendazol muestran niveles comparables con respecto a una reducción en el recuento de células normalizadas a concentraciones de prueba de aproximadamente 10 nM o aproximadamente 10  $\mu$ M, pero muestran actividad diferencial a una concentración de prueba de aproximadamente 1  $\mu$ M. La floxuridina muestra una actividad diferencial mucho más pronunciada a 10 nM que a concentraciones más altas tales como 1  $\mu$ M o 10  $\mu$ M.

En consecuencia, en algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales con un agente de prueba en una pluralidad de concentraciones de prueba y detectar un cambio en el recuento de células para una o más variantes de células madre neoplásicas y para las células madre normales en la pluralidad de concentraciones de prueba. En una realización, la pluralidad de concentraciones de prueba varía en al menos 3 órdenes de magnitud, y opcionalmente al menos 4 o 5 órdenes o magnitudes. En una realización, la pluralidad de concentraciones de prueba varía al menos desde aproximadamente 0,01  $\mu$ M a 2  $\mu$ M, o al menos desde aproximadamente 10 nM hasta aproximadamente 20  $\mu$ M. En una realización, la pluralidad de concentraciones de prueba varía al menos desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 10  $\mu$ M. En una realización, la pluralidad de concentraciones de prueba varía en al menos 3, 4 o 5 órdenes de magnitud e incluye al menos una concentración de prueba entre 10 nM y 10  $\mu$ M, entre 10 nM y 1  $\mu$ M o entre 0,01  $\mu$ M y 2  $\mu$ M. En una realización, la pluralidad de concentraciones de prueba comprende una serie de diluciones, tal como una serie de diluciones de 5 puntos, 8 puntos o 10 puntos, opcionalmente en donde la pluralidad de las concentraciones de prueba varía en al menos 3, 4 o 5 órdenes de magnitud e incluye al menos una concentración de prueba entre 10 nM y 10  $\mu$ M, entre 10 nM y 1  $\mu$ M o entre 0,01  $\mu$ M y 2  $\mu$ M.

En un aspecto de la descripción, un agente de prueba se pone en contacto con células madre normales en una o una pluralidad de concentraciones de prueba y el agente de prueba se pone en contacto con variantes de células madre neoplásicas en una o una pluralidad de concentraciones de prueba y se identifica un agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el contacto con el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales. La identificación de agentes de prueba que muestran actividad diferencial con respecto a la disminución del recuento de células de variantes de células madre neoplásicas en relación con células madre normales ayuda a identificar agentes que son selectivos para células madre de cáncer y exhiben menos toxicidad hacia células madre normales.

Una persona experta puede usar una variedad de métodos para determinar si un agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales. Por ejemplo, en una realización se compara una curva de respuesta a la dosis para el cambio en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas con una curva de respuesta a la dosis para el cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al contacto con el agente de prueba a una pluralidad de concentraciones de prueba. En una realización, se considera que un agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales si a una concentración de prueba única el recuento de células normalizado de las variantes de células madre neoplásicas es al menos 10%, 20%, 30%, 40% o 50% menor que el recuento de células normalizadas de las células madre normales. En una realización, se considera que un agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales si hay una diferencia estadísticamente significativa entre el recuento de células normalizadas de las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales en respuesta a un agente de prueba. En una realización, la diferencia entre el recuento de células normalizadas de las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales en respuesta a un agente de prueba se calcula y/o se compara a una concentración única o sobre una pluralidad de concentraciones de prueba tales como calculando y/o comparando el área bajo una curva de respuesta a la dosis.

En una realización, los métodos descritos en la presente memoria incluyen la determinación de una medida cuantificable del cambio en el recuento de células en respuesta a un agente de prueba para las variantes de células madre neoplásicas y para las células madre normales. Por ejemplo, en una realización, se determina un valor de concentración efectiva máxima media (CE50) para la disminución en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas y un valor de CE50 para la disminución en el recuento de células para las células madre normales. En una realización, se determina la relación de los valores de CE50 para un agente de prueba dado en células madre normales con respecto a variantes de células madre neoplásicas y se identifica un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer si la relación de los valores de CE50 es mayor que un valor

predeterminado. Por ejemplo, en una realización, se identifica un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer si la relación de los valores de CE50 para una disminución en el recuento de células normales con respecto a las variantes de células madre neoplásicas es mayor que 2, 3 o 4. En una realización preferida, se identifica un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer si la ración de los valores de CE50 es mayor que 3.

En otro aspecto de la presente descripción, se investigó el efecto de la densidad de siembra de las variantes de células madre neoplásicas y células madre normales sobre los métodos para identificar y validar un agente o un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer. Como se muestra en la Figura 22 y en el Ejemplo 16, la siembra de las variantes de células madre neoplásicas y células madre normales a densidades de siembra específicas permite la detección rápida y efectiva de agentes selectivos contra células madre de cáncer como se describe en la presente memoria. El uso de densidades específicas de células para sembrar las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales como se describe en la presente memoria ayuda a evitar problemas con la reproducibilidad, el crecimiento errático de células y la debilidad de la señal en los métodos de cribado que utilizan estas células.

En una realización, las variantes de células madre neoplásicas se siembran en un primer receptáculo a razón de aproximadamente 3.000 a 7.000 células por receptáculo y las células madre normales se siembran en un segundo receptáculo a razón de aproximadamente 8.000 a 12.000 células por receptáculo. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas se siembran a razón de aproximadamente 4.000 a 6.000 células por receptáculo y preferiblemente a razón de aproximadamente 5.000 células por receptáculo. En una realización, las células madre normales se siembran a razón de aproximadamente 9.000 a 11.000 células por receptáculo y preferiblemente a razón de aproximadamente 10.000 células por receptáculo.

Los métodos aquí descritos para identificar y validar un agente o un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer pueden opcionalmente realizarse usando placas de microtitulación o receptáculos similares que permitan la separación física de muestras. Por ejemplo, en una realización, las variantes de células madre neoplásicas se siembran en el primer receptáculo y las células madre normales se siembran en el segundo receptáculo y el primer y segundo receptáculos son pozos en la misma placa de microtitulación o pozos en placas de microtitulación separadas. La placa de microtitulación puede ser una placa de microtitulación de 96 pozos, opcionalmente una placa de microtitulación recubierta de 96 pozos u otro recipiente similar con una pluralidad de receptáculos útiles en la automatización de ensayos de cribado.

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden detectar un cambio en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas o células madre normales en respuesta a un agente de prueba. El cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba, opcionalmente aproximadamente 72 horas. El cambio en el recuento de células para las células madre normales se detecta entre aproximadamente 4 días y 6 días después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba, opcionalmente aproximadamente 5 días. En una realización, las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales se ponen en contacto con un agente o un agente de prueba aproximadamente 12 a 36 horas y preferiblemente aproximadamente 24 horas después de sembrar las variantes de células madre neoplásicas, opcionalmente a razón de aproximadamente 3.000 a 7.000 células por receptáculo y las células madre normales a razón de aproximadamente 8.000 a 12.000 células por receptáculo.

Pueden utilizarse una diversidad de métodos conocidos en la técnica para detectar un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas o células madre normales en respuesta a un agente o un agente de prueba. Por ejemplo, en algunas realizaciones se determina un cambio en el recuento de células mediante análisis del contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN), detección de un marcador nuclear tal como histonas o laminina nuclear, condensación nuclear y/o detección nuclear tal como por tinción con fluorocromos de unión a ADN tales como Hoescht, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), naranja de acridina, DRAQ5 o safarina. El cambio en el recuento de células puede detectarse usando un análisis de alto contenido, opcionalmente análisis de imágenes nucleares u otras técnicas adecuadas para su uso en ensayos de cribado de alto rendimiento para detectar un cambio en el recuento de células en respuesta a un agente o un agente de prueba.

Los métodos descritos aquí implican el uso de variantes de células madre neoplásicas y/o células madre normales. Por ejemplo, en una realización, las variantes de células madre neoplásicas se transforman en células madre pluripotentes humanas transformadas (CMPht) o en células madre pluripotentes inducidas transformadas (CMPit) tales como las descritas en la publicación PCT No. WO2011026222. En una realización, las células madre normales son células madre pluripotentes, o células madre pluripotentes inducidas, o células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos.

Algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria comprenden detectar un cambio en la pluripotencia y un cambio en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con un agente y seleccionar un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas. En una

realización preferida, se selecciona un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas. En una realización preferida, las variantes de células madre neoplásicas se ponen en contacto con un agente a una concentración de prueba única con el fin de seleccionar agentes de prueba. El uso de una única concentración de prueba para seleccionar agentes de prueba en una primera etapa minimiza los recursos y el tiempo requeridos para seleccionar e identificar agentes contra células madre de cáncer en los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en una realización las variantes de células madre neoplásicas se ponen en contacto con un agente a 10  $\mu$ M. Opcionalmente, se pone en contacto un agente de prueba con variantes de células madre neoplásicas y células madre normales a una pluralidad de concentraciones de prueba para identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales.

En una realización, se selecciona un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida o pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas. En algunas realizaciones, se selecciona un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida o pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células que es estadísticamente significativa. Por ejemplo, en una realización, se criban una pluralidad de agentes en una placa de microtitulación y se seleccionan como agentes de prueba con base en una desviación estándar de umbral respecto a la media. En una realización, se selecciona un agente como un agente de prueba con base en un umbral de una puntuación Z de al menos 3 desviaciones estándar de la media, opcionalmente de la media de toda la placa para el cambio en pluripotencia y cambio en el recuento de células.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen el uso de controles positivos y/o negativos. Por ejemplo, en una realización se usan variantes de células madre neoplásicas tratadas con una sustancia tal como BMP4 que induce una pérdida de pluripotencia en variantes de células madre neoplásicas como control positivo. En una realización, las células tratadas con al menos 100 ng/mL de BMP4 se usan como control positivo. Otras realizaciones pueden emplear el uso de agentes de diferenciación tales como activina A, ácido retinoico, ácido ascórbico, nicotinamida, insulina o transferrina.

Pueden utilizarse una diversidad de métodos conocidos en la técnica para detectar una pérdida de pluripotencia de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta a un agente. Por ejemplo, en una realización, se detecta un cambio en la pluripotencia de las variantes de células madre neoplásicas detectando un cambio en el nivel de expresión de uno o más marcadores de pluripotencia. Se puede detectar un cambio en el nivel de expresión de un marcador de pluripotencia mediante el uso de detección inmunohistoquímica tal como anticuerpos selectivos para el marcador de pluripotencia o mediante el uso de otros métodos para analizar la expresión de genes tales como RT-PCR cuantitativa. La expresión de uno o más marcadores de pluripotencia también puede estar operativamente unida a un gen indicador en las variantes de células madre neoplásicas y se detecta un producto del gen indicador. En una realización preferida, el gen informador codifica la proteína fluorescente verde (PFV), o un gen que genera un producto de expresión que se detecta fácilmente usando métodos de cribado de alto rendimiento tales como análisis de imágenes. En una realización, el marcador de pluripotencia se selecciona entre Oct4 y Sox2. En una realización, el marcador de pluripotencia se selecciona entre Oct4, Sox2, Nanog, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, receptor de IGF1, conexina 43, E-cadherina, fosfatasa alcalina, REX1, CRIPTO, CD24, CD90, CD29, CD9 y CD49f, y mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, los métodos para identificar y validar un agente o un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer, comprenden además el cribado de un agente de prueba identificado como un agente selectivo contra células madre de cáncer para la actividad en una línea celular de cáncer derivada de un sujeto con cáncer. Por ejemplo, en una realización, la línea celular cancerosa puede ser una línea celular leucémica, opcionalmente una línea celular de leucemia mieloide aguda (LMA). En una realización, la actividad es citotoxicidad, inducción de apoptosis, pérdida de pluripotencia, inducción de diferenciación o combinaciones de los mismos, de la línea celular de cáncer.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria para identificar y validar un agente o agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer comprenden además el cribado de un agente de prueba identificado como un agente selectivo contra células madre de cáncer para inducir la expresión de uno o más genes de respuesta al estrés, opcionalmente uno o más biomarcadores apoptóticos tales como Anexina V, p53 y/o p21.

Se ha determinado sorprendentemente que los compuestos estructuralmente similares a la tioridazina son eficaces para inducir la diferenciación de células madre de cáncer o para matar células madre de cáncer. En particular, los compuestos que son estructuralmente similares a la tioridazina son útiles para inducir selectivamente la diferenciación de células madre de cáncer o reducir la proliferación de células madre de cáncer. Como se muestra en la Figura 26 y Ejemplo 20, el tratamiento de una línea celular enriquecida por células madre de cáncer (CMC) con tioridazina se dirige selectivamente a la población de CMC que expresan receptores de dopamina y da como resultado un aumento en células que expresan CD24.



También se describe un método *in vitro* para inducir selectivamente la diferenciación de una célula madre de cáncer o reducir la proliferación de una célula madre de cáncer que comprende poner en contacto la célula madre de cáncer con un compuesto que tiene un coeficiente de similitud de Tanimoto con tioridazina de al menos 0,6. En un ejemplo, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en tioridazina, proclorperazina, trifluoperazina, flufenazina, perfenazina y triflupromazina. En algunos ejemplos, el compuesto que tiene un coeficiente de similitud de Tanimoto con la tioridazina de al menos 0,6 es un derivado de fenotiazina. En algunos ejemplos, el compuesto induce preferentemente la diferenciación de células madre de cáncer con respecto a las células madre normales.

En algunas realizaciones, el agente contra células madre de cáncer es un antagonista del receptor de dopamina o un agente que selectivamente se dirige a células madre de cáncer como se describe en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a los agentes enumerados en la Figura 23. En una realización, el antagonista del receptor de dopamina tiene un coeficiente de similitud de Tanimoto con la tioridazina de al menos 0,6. Opcionalmente, el antagonista del receptor de dopamina es un derivado de fenotiazina o un compuesto seleccionado entre tioridazina, proclorperazina, trifluoperazina, flufenazina, perfenazina y triflupromazina.

En un aspecto, los métodos descritos en la presente memoria son útiles para determinar un curso de tratamiento o controlar a un sujeto sometido a tratamiento con un agente contra células madre de cáncer mediante la detección de una reducción en células madre de cáncer y/o la diferenciación o pérdida de pluripotencia de células madre de cáncer en respuesta al agente contra células madre de cáncer. En consecuencia, en una realización la determinación de un nivel de células madre de cáncer en la muestra comprende determinar una fracción de células madre de cáncer en relación con células diferenciadas en la muestra. En una realización, la detección de un cambio en la fracción de células madre de cáncer en relación con células diferenciadas en una muestra de un sujeto en el tiempo o en comparación con una muestra de control es útil para determinar un curso de tratamiento o control de un sujeto con cáncer o sospechoso de tener cáncer como se describe en la presente memoria.

En una realización, puede determinarse un nivel de células madre de cáncer en una muestra detectando la expresión de uno o más biomarcadores o una firma de biomarcadores asociados con células madre de cáncer y/o uno o más biomarcadores o una firma de biomarcadores asociados con células diferenciadas. Por ejemplo, las células madre de cáncer se pueden detectar en una muestra probando la muestra para la expresión de uno o más receptores de dopamina (DR) seleccionados de DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 y uno o más de CD14, CD34 y CD44. Como se muestra en la Figura 14, la expresión de DR es indicativa de la presencia de células madre de cáncer. En una realización, la muestra comprende células leucémicas o células sospechosas de ser células leucémicas y los biomarcadores asociados con células diferenciadas se seleccionan entre CD11B+ CD114+ y CD16+. En una realización, la muestra comprende células de cáncer de mama o células sospechosas de ser células de cáncer de mama y el biomarcador asociado con células diferenciadas es CD24-.

En una realización, se puede determinar un nivel de células madre de cáncer en una muestra o un cambio en el nivel de células madre de cáncer en una muestra detectando la expresión de biomarcadores asociados con células madre de cáncer en relación con la expresión de biomarcadores asociados con células diferenciadas. Por ejemplo, en una realización, un aumento en la fracción de células que expresan CD11b en relación con células que expresan biomarcadores asociados con células madre de cáncer leucémico (tales como DR+, CD14+) es indicativo del efecto del agente contra células madre de cáncer en la diferenciación de células madre de cáncer y no simplemente matando las células cancerosas. En una realización, un aumento en la fracción de células que expresan CD24 es indicativo del efecto del agente contra células madre de cáncer en diferenciar células madre de cáncer de mama y no simplemente matar células cancerosas. En una realización, un aumento en la fracción de células que expresan CD24 con respecto a células que expresan CD44, y opcionalmente uno o más receptores de dopamina, es indicativo del efecto del agente contra células madre de cáncer en la diferenciación de células madre de cáncer de mama y no simplemente matando las células del cáncer de mama.

En una realización, el nivel de células madre de cáncer en una muestra se puede determinar detectando la expresión de biomarcadores conocidos en la técnica que se asocian con células madre de cáncer. Por ejemplo, Eppert et al. (2011) y Al-Hajj et al. (2003) (se incorporan por referencia en su totalidad) describen biomarcadores y firmas de expresión génica que están asociados con células madre específicas de cáncer tales como células madre de cáncer leucémico.

Se pueden ensayar muestras para la expresión de biomarcadores asociados con células madre de cáncer o células diferenciadas usando métodos inmunohistoquímicos para detectar niveles de proteína, métodos basados en fluorescencia tales como FACS o RT-PCR o métodos basados en RT-PCR cuantitativa para detectar niveles de transcritos de biomarcadores o utilizando otros métodos como se describen en la presente memoria o conocidos en la técnica.

En una realización, determinar un nivel de células madre de cáncer en una muestra comprende detectar la presencia o ausencia de células madre de cáncer en la muestra. Otros métodos para determinar la presencia o ausencia de células madre de cáncer incluyen el uso de estudios de xenotrasplante en modelos animales tales como ratones.

En una realización, la muestra comprende células cancerosas o células sospechosas de ser células cancerosas. En una realización, la muestra es de un sujeto con cáncer o que se sospecha que tiene cáncer. Opcionalmente, la muestra puede ser una muestra de sangre periférica, o una muestra de médula ósea. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra de tejido tal como una biopsia de tejido u otra toma de muestra biológica de un sujeto con cáncer o que se sospecha que tiene cáncer. Por ejemplo, en algunas realizaciones la muestra es de un sujeto con leucemia e incluye células leucémicas o células sospechosas de ser células leucémicas o es de un sujeto con cáncer de mama e incluye células de cáncer de mama o células sospechosas de ser células de cáncer de mama. Opcionalmente, la muestra se procesa antes de determinar el nivel de células madre de cáncer, para eliminar otros tipos de células o restos celulares o para seleccionar células que son células cancerosas, incluyendo células madre de cáncer. Por ejemplo, en una realización la muestra es una muestra de sangre periférica que contiene células leucémicas y la muestra se enriquece en una población de células que son CD34+ o CD34+ CD38- antes de determinar un nivel de células madre de cáncer. En una realización, la muestra es una muestra de cáncer de mama y la muestra se enriquece en una población de células que son CD44+ CD24- antes de determinar un nivel de células madre de cáncer.

En una realización, la muestra comprende células leucémicas o células sospechosas de ser células leucémicas y determinar la presencia de ausencia de células madre de cáncer comprende ensayar la muestra para CD14 y uno o más biomarcadores asociados con células madre de cáncer tales como DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5. En una realización, la expresión de CD14 y uno o más receptores de dopamina es indicativa de la presencia de células madre de cáncer en la muestra. En una realización, la expresión de CD14, CD34 y uno o más receptores de dopamina es indicativa de la presencia de células madre de cáncer leucémico en la muestra.

En una realización, la muestra comprende células de cáncer de mama o células sospechosas de ser células de cáncer de mama y determinar la presencia de ausencia de células madre de cáncer comprende ensayar la muestra por la expresión de CD44 y CD24. En una realización, detectar células que expresan CD44 y no expresan CD24 es indicativa de la presencia de células madre de cáncer.

Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la presente divulgación:

#### Ejemplos

Ejemplo 1: La tioridazina es citotóxica para las líneas celulares leucémicas

El efecto de la tioridazina sobre el número de células normalizadas se evaluó en 3 líneas de células leucémicas: HL-60, MV4-11 y OCI-AML3. Todas las tres líneas son líneas celulares leucémicas. HL-60 se derivó de LMA promielocítica, mientras que MV 4-11 y OCI-AML3 son representativos de la LMA. Cada compuesto se incubó con las células durante 72 h. El control fue DMSO (es decir, el vehículo utilizado para el compuesto) durante 72 h. Cada condición tenía tres repeticiones.

Tal como se muestra en la Figura 1, las dosis de 0,1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  de tioridazina tuvieron poco efecto sobre el número de células normalizadas, mientras que a 10  $\mu\text{M}$  el número de células normalizadas se redujo a casi cero.

Ejemplo 2: Actividad diferencial de la tioridazina sobre el potencial de formación de blastocitos de LMA y el potencial de formación de colonias de células madre normales

Los efectos de la tioridazina sobre la formación de blastocitos en una línea celular de LMA se compararon con el efecto de la tioridazina sobre la formación de colonias en células madre humanas normales.

Las CMH y progenitores normales procedían ya sea de sangre periférica movilizada o sangre de cordón umbilical de pacientes sanos. Las células de LMA primaria fueron tomadas de pacientes diagnosticados con LMA. Tanto CMH normales como células de LMA primaria se cultivaron bajo condiciones de prueba de metocelulosa *in vitro* estándar (véase <http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/MethoCult-H4434-Classic.aspx>, así como Clinton Campbell et al. The human stem cell hierarchy is defined by a functional dependence on Mcl-1 for self-renewal capacity. Blood 116 (9) 1433-1442 (4 de junio de 2010), incorporada aquí por referencia) durante al menos 14 días antes del registro del número de colonias. Como se muestra en la Figura 2, tioridazina 10  $\mu\text{M}$  tiene un efecto diferencial sobre las CMH normales frente a las células de LMA. La tioridazina 10  $\mu\text{M}$  redujo el potencial de formación de colonias de CMH normales de aproximadamente 100 (CTRL tratado con DMSO) hasta aproximadamente 66 colonias totales (Figura. 2A), pero tuvo un efecto mucho más significativo en células de LMA reduciendo el número de colonias de UFC hasta aproximadamente 22 colonias de blastocitos (Figura. 2B) hasta 1,6 colonias de blastocitos.

La Figura 3 muestra pellas de células de colonias de UFC generadas a partir de CMH normales y LMA tratadas con tioridazina. A una dosis de 10  $\mu\text{M}$ , las células sedimentadas son todavía visibles para las CMH, pero no para células de LMA. Por tanto, la tioridazina se dirige selectivamente al potencial de UFC de blastocitos de células de LMA.

Ejemplo 3: La clorpromazina es tóxica para las líneas celulares de LMA

También se investigó el antagonista del receptor de dopamina y el compuesto clorpromazina relacionado con fenotiazina para efectos sobre las líneas celulares de LMA HL-60, MV4-11 y OCI-AML3. La prueba se llevó a cabo como se muestra en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Figura 4, 10  $\mu\text{M}$  de clorpromazina es tóxico para las líneas celulares de LMA.

5

Ejemplo 4: Expresión de receptores de dopamina en sangre normal frente a leucemia

La expresión de los receptores de dopamina DR1, DR2, DR3, DR4 y DR5 se analizó en líneas celulares de LMA (HL-60, MV4-11, LMA-OCI2 y LMA-OCI3), células de LMA primaria (AML22101, AML29428, AML22174, AML29560) aisladas de pacientes con LMA, células mononucleares sanguíneas normales (MNC) (MPB21471 y MPB28137; sangre de paciente sano), así como células primarias de sangre de cordón umbilical enriquecidas con células madre humanas o progenitoras normales (CB107, CB108 y CB109) utilizando el kit de enriquecimiento de células progenitoras hematopoyéticas humanas StemSep® (<http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/StemSep-Human-Hematopoietic-Progenitor-Cell-Enrichment-Kit.aspx>) y los niveles de enriquecimiento de CMH/progenitoras humanas confirmados por citometría de flujo. La expresión de isotipo se midió como fondo. Los picos a la derecha del pico del isotipo representan la expresión positiva de los marcadores de DR.

Como se muestra en la Figura 5, los receptores de dopamina se expresan en líneas celulares de LMA primaria, LMA y células de sangre mononucleares normales (CMN) pero no en sangre enriquecida por CMH normales (CB(sin linaje)). Los datos muestran que cuando la muestra es positiva para la expresión de DR que todos los cinco subtipos de DR están normalmente presentes.

No todas las LMA primarias se observaron para expresar receptores de dopamina. En consecuencia, los sujetos pueden ser cribados previamente para la expresión de receptores de dopamina con el fin de identificar sujetos adecuados para el tratamiento de LMA con antagonistas de DR. Opcionalmente, el cribado previo de sujetos puede abarcar todos los cinco subtipos de DR, o subtipos específicos o combinación de subtipos.

Ejemplo 5: Los antagonistas de DR múltiples son citotóxicos para las líneas celulares de LMA

Se ensayaron una serie de agonistas de receptores de dopamina, antagonistas de  $D_3$ , antagonistas de  $OR_{1y5}$  y antagonistas de múltiples receptores para determinar la citotoxicidad contra tres líneas celulares de LMA HL-60, OCI-AML2 y OCI-AML3. El ensayo se realizó como se expone en el Ejemplo 1.

Como se muestra en la Figura 6, CLOZ a concentraciones más altas, así como CHL y THIO tienen un efecto significativo sobre la citotoxicidad de las líneas celulares de LMA. Sin estar limitado por la teoría, el efecto citotóxico puede requerir la inhibición de múltiples receptores de dopamina. THIO, CHL y CLOZ que son antagonistas de múltiples receptores trabajan para erradicar las líneas celulares de LMA mientras que los antagonistas específicos de  $D_3$  y  $DR_{1y5}$  reducen solamente el conteo de células al 60%.

Ejemplo 6: Los receptores de dopamina se expresan en la población de células CD14+ de LMA primaria

La expresión de los subtipos de receptores de dopamina se analizó en células de LMA primarias. Las células de LMA primaria obtenidas de pacientes con LMA fueron teñidas conjuntamente con anticuerpos específicos para el subtipo de DR y CD14 antes de ser analizadas usando citometría de flujo. Se encontró que la mayoría de las células de DR+ eran positivas para CD14.

Como se muestra en la Figura 7, la expresión del marcador monocítico CD14 está correlacionada con la expresión de cada subtipo de DR.

Los efectos de la tioridazina también se examinaron en una subpoblación de células CD14+ en LMA primaria. Las células de LMA primaria se cultivaron bajo control (vehículo DMSO) o tioridazina 10  $\mu\text{M}$  durante 72 horas y luego se teñieron con anticuerpos específicos para CD14. Se determinó el número de células CD14+ tanto en muestras tratadas con control como con tioridazina usando citometría de flujo y se encontró que la frecuencia de células CD14+ era menor en la muestra tratada con tioridazina, lo que sugiere que este compuesto se dirige selectivamente a la subpoblación de CD14+ en células de LMA.

Tal como se muestra en la Figura 8, la tioridazina 10  $\mu\text{M}$  también redujo la frecuencia normalizada de las células CD14+ en células de LMA primaria, mostrando que la tioridazina se dirige selectivamente a las células CD14+. El grupo de control de LMA contenía una fracción de células CD14+. Esta fracción se reduce con el tratamiento con tioridazina y se representa como una reducción en la frecuencia normalizada del control (100%) frente a las tratadas (20%).

Ejemplo ilustrativo 7: Identificación y caracterización de fármacos que inducen la diferenciación de CMPH

La identificación de fármacos que se dirigen a células madre de cáncer (CMC) sin afectar a las células madre normales (CM) sería ideal para futuras terapias contra el cáncer, pero está limitada por la falta de pruebas para CMC

y CM normales en humanos que son susceptibles cribados biológicos robustos. Como se establece en los siguientes ejemplos, utilizando una plataforma de diferenciación de células madre pluripotentes humanas normales (CMPH) frente a neoplásicas, se identificaron compuestos que no son tóxicos, pero inducen diferenciación para vencer la autorrenovación neoplásica de las CMC. De los diversos agentes candidatos identificados contra CMC, la tioridazina, un fármaco antipsicótico aprobado, fue capaz de dirigir de forma selectiva CMC somáticas humanas capaces de iniciar la enfermedad leucémica *in vivo* sin tener ningún efecto sobre la capacidad de CM de sangre normal. El antagonismo de la señalización del receptor de dopamina (DR) por la tioridazina forma la base del direccionamiento selectivo de CMC, y reveló DR como un biomarcador para CMC originadas en tumores hematopoyéticos y de mama.

10 Procedimientos experimentales

Generación de líneas EOS-GFP de CMPH neoplásicas. Se transdujeron células CMPH v1H9 o v2H9 neoplásicas (Werbowski-Ogilvie et al., 2009) con lentivirus que portaba los vectores EOS-C3+ o EOS-S4+ proporcionados por el Dr. James Ellis (Hotta et al., 2009). Después de la transducción lentiviral se seleccionaron las células utilizando Puromicina, y posteriormente se clasificaron como células individuales en una placa de 96 pozos con base en la expresión de GFP utilizando un FASCARIA II (Becton-Dickinson). Las colonias generadas a partir de clones de células individuales se usaron para establecer las líneas v1H9-Oct4-GFP (EOS-C3+), v2H9-Oct4-GFP (EOS-C3+) y v1H9-Sox2-GFP (EOS-S4+).

20 Cultivo celular. Se cultivaron las CMPi derivadas de CMEh H9, v1H9, v1H9-Oct4-GFP, v2H9-Oct4-GFP, v1 H9-Sox2-GFP y derivadas de fibroblastos como se describió anteriormente (Chadwick et al., 2003; Werbowetski-Ogilvie et al. 2009).

25 Muestras humanas primarias. Para los especímenes de LMA, se recogió sangre periférica y/o de médula ósea en el momento de la presentación clínica. Se obtuvieron células hematopoyéticas sanas a partir de muestras de sangre de cordón umbilical. Todas las muestras se obtuvieron después del consentimiento informado de acuerdo con los protocolos aprobados por la Junta de Ética de Investigación en la Universidad McMaster y el Centro de Ciencias de la Salud de Londres. Las muestras de tumor de mama humano se obtuvieron de cirugías de mamoplastia de reducción después del consentimiento informado de acuerdo con los protocolos aprobados por la Junta de Ética de Investigación en la Universidad de McMaster.

30 Plataforma de cultivo *in vitro* para CMPH normales y neoplásicas. Los cribados químicos implicaron células v1H9-Oct4-GFP sembradas a razón de 5.000 células por pozo en medio acondicionado con fibroblasto embrionario de ratón (MAFER) complementado con 8 ng/mL de FbCF. 24 horas más tarde se intercambió el medio por MAFER con compuestos a 10  $\mu$ M y DMSO al 0,1%, DMSO al 0,1% (-BMP4) o 100 ng/mL de BMP4 y DMSO al 0,1% (+BMP4) durante 48 horas antes de ser intercambiados con medios frescos con el compuesto durante 24 h adicionales (tiempo total de tratamiento con el compuesto de 72 horas) antes de fijarse y prepararse para la formación automatizada de imágenes y el análisis del lector de placas. Se sembraron CMPi derivadas de H9 y fibroblastos confluentes a razón de 10.000 células por pozo en MAFER complementado con 8 ng/mL de FbCF. 24 horas más tarde se trataron las células con compuestos a 10  $\mu$ M y DMSO al 0,1%, DMSO al 0,1% (-BMP4) o 100 ng/mL de BMP4 y DMSO al 0,1% (+BMP4). Se intercambió el MAFER fresco complementado con compuestos diariamente durante 5 días. El día 5, se fijaron las CMPH y prepararon para la formación automatizada de imágenes y análisis del lector de placas. Véanse los procedimientos experimentales suplementarios para más detalles.

45 Ensayo de Teratoma. Se inyectaron intratesticularmente 400.000 CMEh H9 o v1H9-Oct4-GFP en ratones NOD/SCID machos y se analizaron los teratomas para Oct4 como se ha descrito previamente. (Werbowski-Ogilvie et al., 2009).

50 Ensayos de xenotrasplantes. Se irradiaron en forma casi letal ratones adultos NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) con 315 rads 24 horas antes del trasplante. Se inyectaron 0,8-1,0 x 10<sup>7</sup> CMN de LMA o 1,5-1,8 x 10<sup>5</sup> células hematopoyéticas de CB sin linaje tratadas con compuesto o vehículo DMSO durante 24 horas a través de la vena de la cola (IV). Después de 6-10 semanas, los animales fueron sacrificados, y se analizaron la MO y el bazo para detectar la presencia de células humanas mediante citometría de flujo (LSRII, BD) y los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc). Para los trasplantes de CMPH secundarias, se inyectaron en forma IV igual número de células humanas injertadas de trasplantes de CB sin linaje en ratones NSG irradiados adultos como se describe para trasplantes primarios.

60 Análisis estadístico. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM o la media  $\pm$  DE. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron utilizando la prueba t de Student bidireccional o unidireccional no apareada.

65 Cultivo de células madre pluripotentes. Se cultivaron las células CMEh H9, v1H9, v1H9-Oct4-GFP, v2H9-Oct4-GFP, v1H9-Sox2-GFP y CMPi derivadas de fibroblastos en placas recubiertas con Matrigel<sup>MR</sup> (BD Biosciences 353234) con medio acondicionado con fibroblastos embrionarios de ratón (MAFER) complementado con 8 ng/mL de FbCF (GIBCO 13256-029). MAFER está compuesto por KO-DMEM (GIBCO 10829-018), 20% de reemplazo de suero KO (GIBCO 10828-028), 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO 11140-050), L-Glutamina 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma Aldrich M7522). Las líneas celulares se pasaron cada 7 días usando 100 Unidades/mL de colagenasa IV

(GIBCO 17104-019) durante 2-3 minutos. La densidad de siembra de células, la duración del ensayo y la concentración del vehículo DMSO en 96 pozos se optimizaron para las células v1H9-Oct4-GFP y CMPH H9 normales. Para v1H9-Oct4-GFP, se seleccionó una densidad inicial de siembra óptima de 5.000 células por pozo durante 72 h de tratamiento con base en los niveles máximos de GFP y discriminación de  $z'$  entre los controles  $\pm$  BMP4. Para CMPH normales, se seleccionó una densidad de siembra óptima de 10.000 células por pozo con base en la discriminación máxima de  $z'$  entre los controles  $\pm$  BMP4.

Muestras humanas primarias. Se prepararon células mononucleares usando Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare). Para las células hematopoyéticas, el agotamiento del linaje se realizó utilizando EasySep (StemCell Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cultivo de células LMA/CMPH. Se cultivaron líneas de células de LMA, a saber, OCI-AML2 (M4), OCI-AML3 (M4), HL-60 (M2) y MV-4-11 (M5) en RPMI (Gibco) complementado con FBS inactivado con calor al 5% (HyClone). Para los estudios de agonistas de DR con bromhidrato de R(+)-7-hidroxi-DPAT (Sigma), se emplearon condiciones libres de suero debido a la prevalencia de dopamina en FBS (Little et al., 2002). Los blastocitos de pacientes con LMA se cultivaron en IMDM complementado con 5% de FBS inactivado por calor (HyClone), 5 ng/mL de IL3 (sistemas R&D),  $5 \times 10^{-5}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) y BIT (StemCell Technologies). El medio de CMH contenía IMDM complementado con BSA al 1% (Sigma), 100 ng/mL de SCF (sistemas R&D), 100 ng/mL de Flt-3L (sistemas R&D) y 20 ng/mL de TPO (sistemas R&D). Se trataron las muestras de CMPH y LMA del paciente con compuesto o vehículo DMSO (0,1%) durante 24 horas antes de los estudios de siembra en placa de UFC o de xenotrasplantes.

Anticuerpos. Los anticuerpos utilizados para la inmunocitoquímica fueron los siguientes: Oct3/4 (BD Transduction Laboratories, cat. # 611203), Sox2 (R&D, cat. # AF2018). Para detectar células hematopoyéticas humanas, se usó CD45 anti-humana marcada con Pacific Blue, PE, APC o FITC (BD Biosciences). Se adquirieron los anticuerpos FITC anti-CD33, PE anti-CD13, FITC anti-CD41a, FITC anti-HLA DR y PE anti-CD19 de BD Pharmingen. Se adquirieron PE anti-CD14, PE anti-CD15 y PE anti-GlyA de Immunotech Beckman Coulter. Para determinar la pluripotencia, PE anti-SSEA3 (BD Biosciences) y PE o AlexaFluor488 anti-Oct4 (BD Biosciences). Anticuerpos del receptor de dopamina anti- humana de conejo; se obtuvieron DRD1 (Cat. # 324390), DRD2 (Cat. # 324393), DRD3 (Cat. # 324402), DRD4 (Cat. # 324405) y DRD5 (Cat. # 324408) de EMD Chemical. Como anticuerpo secundario se utilizó Alexa-Fluor-488 anticonejo (Molecular Probes). Se utilizaron IgG de conejo anti-p53 primario (Cat. # 2527) y anti-p21 (Cat. # 2947) originarias de Cell Signaling Technology para teñir células fijas y permeabilizadas. Se utilizó alexa-Fluor-546 anticonejo (Molecular Probes) como anticuerpo secundario. Para la tinción del tumor de mama, se obtuvieron APC anti-CD44 y PE-CD24 de BD Pharmingen.

#### Formación de imágenes automatizadas y análisis

Formación de imágenes de CMPH neoplásicas. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2% y se tiñeron con 10  $\mu$ g/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen) con un dispensador de múltiples gotas Combi (Thermo). Para los experimentos que involucraron la inmunocitoquímica Oct4, se usó un anticuerpo monoclonal para Oct4 (BD) junto con un Alexa-Fluor-647 secundario (Invitrogen). La tinción inmunocitoquímica se realizó mediante un manipulador de líquidos automatizado Janus (Perkin Elmer). Las imágenes fueron adquiridas a 10x N.A con un lector Arrayscan HCS VTI (Cellomics) por medio de iluminación de epifluorescencia y conjuntos de filtros estándar.

Formación de imágenes de CMPH normales. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2% y se tiñeron con 10  $\mu$ g/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen). Se usaron técnicas estándar de inmunocitoquímica de fluorescencia para teñir las células con un anticuerpo monoclonal para Oct4 (BD), y un anticuerpo Alexa-Fluor-647 secundario (Invitrogen). Todas las etapas se realizaron mediante un manipulador de líquidos automatizado Janus (Perkin Elmer). Las imágenes se adquirieron a 5x con un lector HCS Arrayscan (Cellomics) por medio de iluminación de epifluorescencia y conjuntos de filtros estándar.

Análisis de imagen. El análisis de la imagen se realizó utilizando conjuntos de instrucciones personalizados en el software Acapella (Perkin Elmer). Los objetos nucleares se segmentaron de la señal de Hoechst. Para las líneas celulares neoplásicas, el análisis de la intensidad de los objetos se realizó únicamente en las células GFP positivas. Para las líneas celulares normales, se cuantificó la fracción de células Alexa-Fluor-647-positivas. Las imágenes y los datos del nivel de pozo se almacenaron y analizaron en una base de datos Columbus (Perkin Elmer) y análisis de datos adicionales, registro de compuestos e identificación de los aciertos en ActivityBase (IDBS).

Análisis de la expresión génica. Se recolectaron células en condiciones específicas y se extrajo el ARN usando un kit de RNeasy (Qiagen), generación de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit de síntesis de ADNc SuperScript III® (Invitrogen), amplificación previa y reacción de matriz TaqMan® (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El perfil de expresión génica para cada población de células tratadas se analizó utilizando una tarjeta matriz de pluripotencia de células madre TaqMan® en un sistema de PCR en tiempo real ViiA 7 (Applied Biosystems). Cada muestra de reacción se dispuso en pozos de carga en la tarjeta matriz y se centrifugó dos veces a 336 x g durante 1 min cada vez, se selló y se colocó en el termociclador. Se usaron las siguientes condiciones de los ciclos para todas las aplicaciones de tarjetas matriz: 45°C durante 10 min, 94°C durante 10 min y 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos seguido por 60°C durante 1 min. Los datos de la matriz se normalizaron a

ARN 18S y GAPDH y las comparaciones se realizaron utilizando el software de análisis de datos 2.0 (Applied Biosystems).

- 5 Ensayo de formación de colonias de metilcelulosa. Se cultivaron las células linfocíticas de pacientes con LMA o células de CB sin linaje durante 24 horas en presencia del compuesto o control de DMSO como vehículo (0,1%). Se sembraron células de LMA a razón de 50.000 células/mL en Methocult GF H4434 (Stem Cell Technologies). Las células de CB sin linaje se sembraron a razón de 1.000 células/mL en Methocult GF H4434 (Stem Cell Technologies). Se hizo recuento de colonias después de 14 días de cultivo usando criterios morfológicos estándar.
- 10 Recuento volumétrico de células. El número de células LMA-OCI2 y LMA-OCI3 presentes después de 72 horas de tratamiento con antagonistas de DR (Figura 16b) y agonista (Figura 16c-d) se contaron midiendo el número de eventos dentro de un volumen fijo siguiendo la estrategia de rejilla definida por dispersión directa y agrupación de dispersión lateral, 7AAD- y Hoechst+.
- 15 Procesamiento de muestras de cáncer de mama humano. Las muestras de tumor de mama humano se obtuvieron de cirugías de mastoplastia de reducción después del consentimiento informado de acuerdo con los protocolos aprobados por la Junta de Ética de Investigación en la Universidad de McMaster. Los trozos de tumor de mama se cortaron en pequeños fragmentos (trozos de menos de 1 mm) con tijeras y bisturí. Posteriormente, se añadieron 3 mL de Versene (1 mL de EDTA 0,5 M en 1 L de PBS 1X) y 7 mL de solución de tripsina-colagenasa para cada gramo de tejido tumoral y se incubaron durante 30 min a 37°C. La solución de tripsina-colagenasa consistió en RPMI 1640 (Gibco # 11875093), 2% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen # 15140163), 1% de antimicótico Fungizone (Invitrogen # 15290018), 2% de FBS, 3 mg/mL de Colagenasa A (Roche Diagnostics # 11088793001), y 0,1% de tripsina al 2,5% (Gibco # 15090). Se añadió entonces un volumen igual de RPMI 1640 con 2% de FBS a la suspensión de tejido. La suspensión de tejido se filtró a través de un filtro de nylon de 40 µm (Falcon # 352340). El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 10 mL de mezcla nutriente F-12 + GlutaMAX Ham 1X (Gibco # 31765) complementado con 2% de penicilina/estreptomicina y 1% de antimicótico Fungizone. Se contaron las células viables utilizando un hemocitómetro y una solución de azul de tripán y se prepararon para citometría de flujo. La tinción de anticuerpos incluía anticuerpos de conejo anti-receptor de dopamina humana; DRD1 (Cat. #324390), DRD2 (Cat. #324393), DRD3 (Cat. #324402), DRD4 (Cat. #324405) and DRD5 (Cat#324408), se obtuvieron de EMD Chemical y se usó Alexa-Fluor-488 anti-conejo (Molecular Probes) como anticuerpo secundario junto con APC anti-CD44 y PE-CD24, ambos procedentes de BD Pharmingen.
- 20
- 25
- 30

Ejemplo ilustrativo 8: Identificación mediante cribado de alto rendimiento de compuestos que inducen diferenciación de CMPH neoplásicas

- 35 Los inventores han descrito previamente una variante de línea de células madre pluripotentes humanas (CMPH) que muestra características neoplásicas que incluyen autorrenovación y supervivencia mejoradas, junto con bloqueo aberrante en la capacidad de diferenciación terminal *in vitro* e *in vivo* (Werbowetski-Ogilvie et al., 2009). Con base en estas similitudes en las propiedades funcionales con las CMC somáticas, se examinaron las CMPH neoplásicas como un sustituto para las CMC somáticas que serían susceptibles de alto contenido y cribado de alto rendimiento *in vitro*. Se desarrolló una plataforma de cribado para identificar moléculas pequeñas que selectivamente se dirigen a CMPH neoplásicas mientras que tienen poco efecto en CMPH normales. Esta plataforma de cribado diferencial es capaz de identificar potentes fármacos candidatos que se dirigen selectivamente a CMC somáticas mientras se ahorra capacidad de CM sanas.
- 40
- 45

- Oct4 y Sox2 proporcionan un indicador confiable de pérdida autorrenovación del estado pluripotente e inducción de diferenciación de CMPH normales y neoplásicas. Para proporcionar un método más directo para detectar la pérdida de Oct4 o Sox2 durante la diferenciación inducida de CMPH neoplásicas, se generaron líneas informadoras de GFP mediante transducción de CMPH neoplásicas con el informador EOS-GFP (v1H9-Oct4-GFP y v1H9-Sox2-GFP, respectivamente) (Hotta et al., 2009). Se observó correlación entre la intensidad de GFP y la expresión de Oct4 y Sox2 en tratamientos que favorecieron la estabilidad de autorrenovación y condiciones que inducen diferenciación con la adición de BMP4. Esta respuesta se encontró consistentemente utilizando una línea de CMPH neoplásica adicional, v2H9 (Werbowetski-Ogilvie et al., 2009) transducida con el mismo informador de GFP del lentivirus EOS (v2H9-Oct4-GFP), así como una línea informadora Sox2 (v1H9-Sox2-GFP).
- 50
- 55

- La respuesta uniforme a la diferenciación y el mantenimiento de la pluripotencia en todas las líneas celulares de CMPH generadas también reveló que la integración viral o la selección clonal mediante inserción del constructo informador EOS es irrelevante para la sensibilidad. Estos resultados sugieren que los compuestos que inducen la diferenciación pueden identificarse basándose en la reducción de la intensidad de GFP en las líneas informadoras de CMPH neoplásicas y podrían ser explotados para el cribado químico. Para tal fin, se utilizaron condiciones para la microscopía automatizada de alto contenido y el cribado fluorométrico de alto rendimiento para detectar reducciones en la expresión del marcador de pluripotencia de CMPH. El análisis microscópico de CMPH normales mostró que se pierden células distintas Oct4+ después del tratamiento con BMP4. Del mismo modo, la reducción de la GFP y Oct4 debido al tratamiento con BMP4 de las CMPH Oct4-GFP neoplásicas se cuantificó mediante microscopía de alto contenido y fluorometría con base en el lector de placas. Para identificar candidatos ideales, se evaluó en paralelo el
- 60
- 65

direccionamiento para la diferenciación de CMPH tanto de CMPH normales como neoplásicas en respuesta al tratamiento con compuesto.

Dada la validación de la plataforma de cribado, se seleccionaron bibliotecas químicas compuestas de 590 compuestos anotados bien establecidos de la colección clínica de NIH y se cribó la colección de compuestos canadienses. Estas colecciones se han examinado previamente en numerosas otras líneas celulares de mamíferos (Diallo et al., 2010; Shoemaker, 2006). Después de la demostración de que las plataformas de cribado fluorométrico de alto rendimiento (HTS) y el cribado de alto contenido (HCS) producen mediciones equivalentes para la pérdida de pluripotencia (RFU de GFP e intensidad media de GFP por celda, respectivamente) y el recuento de células (RFU de Hoechst y recuento de células) de los 51 compuestos definidos, se seleccionó HTS como la plataforma preferida para cribar más rápidamente las bibliotecas de compuestos (Figura 9a). De los 590 compuestos cribados (a 10  $\mu$ M con base en estudios previos (Inglese et al., 2007)), se identificaron 11 compuestos para inducir diferenciación como se indica por una reducción tanto en el porcentaje de actividad residual de GFP (% RA) como % RA de Hoechst (Figuras 9b-c). Un total de 4 de estos compuestos; indatralina, tioridazina, azatioprina y mefloquina, se identificaron como compuestos candidatos con base en agrupaciones y niveles % RA de Hoechst superiores a 30% (Figura 9b). El análisis de alto contenido secundario reveló que la indatralina es un candidato cuestionable y, por lo tanto, se excluyó, mientras que el análisis de contenido y los análisis HTS confirmaron doblemente la tioridazina, azatioprina y mefloquina como compuestos candidatos (Figura 9d) y se seleccionaron para pruebas adicionales (Figuras 9e-g). Cuando se comparó con las CMPH tratadas de control, cada compuesto parecía inducir cambios morfológicos distintos en CMPH neoplásicas (Figura 9e). La reducción en la intensidad de GFP se confirmó mediante análisis de imagen (Figura 9f) y se evaluó adicionalmente en una amplia gama de dosis para calcular la mitad de la concentración máxima eficaz (CE50) para cada compuesto (Figura 9g). Se encontró que solamente la tioridazina y la mefloquina poseen valores de CE50 inferiores al umbral objetivo de 10  $\mu$ M (Figura 9g) y, por lo tanto, se definieron como candidatos para una evaluación más profunda usando CMPH neoplásicas y CMC somáticas de pacientes.

Ejemplo 9: La tioridazina induce selectivamente la diferenciación de CMPH neoplásica y reduce los blastocitos de LMA humana sin afectar las células madre/progenitoras hematopoyéticas normales

Las respuestas a la tioridazina y la mefloquina se evaluaron tanto en CMPH normales (Figura 10a) como neoplásicas (Figura 10b) a tres concentraciones usando citometría de flujo cuantitativa para detectar la pérdida de Oct4 y revelar el grado de diferenciación. La salinomicina, un inhibidor selectivo reportado de CMC de mama (Gupta et al., 2009), se incluyó para comparación. A 10  $\mu$ M, todos los compuestos redujeron el número de células, pero los niveles de Oct4 en las CMPH normales restantes no fueron inferiores a los niveles observados con tratamiento con BMP4 (Figura 10a). Esta misma respuesta se replicó en células MPi humanas derivadas de fibroblastos, (Figura 11a), que representan una línea adicional de CMPH normal de un origen distinto (adulto), indicando que los efectos no son específicos para las fuentes embrionarias. Cuando se usaron los mismos compuestos para tratar CMPH neoplásicas, los tratamientos con mefloquina y tioridazina provocaron reducciones en el número de células y los niveles de Oct4 en CMPH neoplásicas. Sólo la tioridazina fue capaz de reducir los niveles de Oct4 por debajo de los controles de diferenciación con BMP4 (Figura 10b), lo que indica la capacidad de la tioridazina para superar el bloque de diferenciación de CMPH neoplásicas. Se llevó a cabo una respuesta de dosis más completa de todos los compuestos sobre las CMPH neoplásicas para confirmar esta respuesta (Figura 11b). Para identificar los compuestos que diferencian selectivamente las CMPH neoplásicas cuantitativamente, se determinó la proporción de porcentaje normalizado de células Oct4+ entre CMPH normales y neoplásicas en respuesta a estos compuestos. Por ejemplo, una proporción de 1 sugiere una diferenciación equivalente mientras que una relación >1 define relativamente más diferenciación en CMPH neoplásicas frente a CMPH normales. Sólo la tioridazina, tanto a 1  $\mu$ M como a 10  $\mu$ M, tuvo un impacto significativo sobre la inducción de la diferenciación de CMPH neoplásicas sobre CMPH normales (Figura 10c). La acumulación rápida del marcador de tensión celular p53 (Figura 10d) y su objetivo transcripcional p21 (Figura 10e) se utilizaron para distinguir adicionalmente la inducción de diferenciación de la toxicidad celular. El tratamiento de CMPH neoplásicas con el agente quimioterapéutico tóxico etopósido dio como resultado altos niveles de p53 y p21 después de 24 h. Sin embargo, el tratamiento con tioridazina 10  $\mu$ M o BMP4, a diferencia de los agentes que inducen solamente toxicidad, no dio lugar a acumulación de p53 o p21, consistente con la diferenciación inducida en lugar de programas de respuesta al estrés. Además, el tratamiento con tioridazina condujo a la expresión de genes de diferenciación cuantificados mediante TaqMan, un PCR cuantitativo de un arreglo de baja densidad en CMPH neoplásicas. Se observó una sobrerregulación en 21 de los 50 genes asociados a la diferenciación (Figura 10f) en CMPH neoplásicas tratadas en consonancia con los efectos inductores de diferenciación de la tioridazina.

Para examinar las similitudes potenciales en la respuesta química de CMPH neoplásicas con respecto a CMC somáticas, se evaluaron poblaciones normales y neoplásicas del sistema hematopoyético humano. Experimentalmente, la autorrenovación y la diferenciación tanto de las células madre-progenitoras hematopoyéticas humanas (CMPH) como de las células madre leucémicas (CML) pueden ser interrogadas por poderosos y bien establecidos ensayos *in vitro* e *in vivo* únicamente disponibles para el sistema hematopoyético, convirtiéndolo en un tejido ideal para evaluar la subrogación potencial del uso de CMPH normales y neoplásicas como una herramienta de cribado primario para compuestos anti-CMC. La sangre del cordón umbilical (CB sin linaje), está altamente enriquecida por CMPH y es una fuente confiable de CM somáticas normales capaces de autorrenovación y diferenciación multilineaje para todos los linajes sanguíneos. La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia

hematológica caracterizada por un bloqueo en la diferenciación mielóide madura que es sostenida por una CML autorrenovable (Bonnet y Dick, 1997; Lapidot et al., 1994).

Como tal, se llevaron a cabo ensayos de progenitor en metilcelulosa con CMPH y muestras de 5 pacientes con LMA; cada uno tratado con tioridazina, mefloquina o salinomicina con el fin de evaluar el impacto de cada compuesto sobre la diferenciación hematopoyética clonogénica y multilinaje *in vitro*. Se muestran pellas de células representativas de las unidades formadoras de colonias totales (UFC) generadas a partir de CMPH (Figura 10g) y LMA (Figura 10h) tratadas con cada compuesto. El tratamiento con tioridazina dio lugar a una reducción en la capacidad de proliferación/clonogénica de LMA, al mismo tiempo que retiene la diferenciación multilinaje de CMPH (Figura 11c). Los cambios en la diferenciación multilinaje se cuantificaron basándose en la enumeración de UFC generadas después del tratamiento de CMPH (Figura 10i) y muestras del paciente con LMA (Figura 10j) con estos compuestos. La salinomicina tanto a 1  $\mu\text{M}$  como a 10  $\mu\text{M}$  redujo el potencial de UFC de blastocitos de LMA (Figura 10j), pero también redujo el potencial de UFC de CMPH sobre todas las dosis ensayadas (Figura 10i) indicativas de toxicidad no específica en el sistema hematopoyético. Por el contrario, la mefloquina y la tioridazina redujeron la formación de UFC de blastocitos de LMA (Figura 10j) aunque tienen poco efecto sobre el potencial de UFC de CMPH (Figura 10i) y la composición de multilinaje (Figura 11d) indicando que la mefloquina y la tioridazina no alteran la hematopoyesis normal.

El resultado más deseado de los compuestos identificados hacia el uso clínico implicaría la eliminación preferencial de la generación de UFC de blastocitos de LMA mientras se preserva la capacidad progenitora CMPH normales. Se calculó la relación entre las UFC totales generadas a partir de CMPH frente a blastocitos de LMA para revelar la mayor selectividad para direccionamiento a LMA (Figura 10k). Una proporción de 1 sugiere un potencial progenitor normal a neoplásico equivalente mientras que una proporción  $>1$  define un compuesto que reduce selectivamente el potencial de UFC de blastocitos de LMA. Las dosis de salinomicina (1  $\mu\text{M}$ ), mefloquina (10  $\mu\text{M}$ ) y tioridazina (10  $\mu\text{M}$ ) produjeron los valores de relación más altos para cada compuesto (Figura 10k) y, por lo tanto, se seleccionaron para la evaluación *in vivo*. La tioridazina 10  $\mu\text{M}$ , en particular, demostró la proporción más alta de todos los compuestos, pero lo más importante fue que el único compuesto que mostró un potencial UFC de blastocitos de LMA significativamente menor con respecto al potencial de UFC de CMPH normales (Figura 10k). Para determinar si la especificidad de la tioridazina para reducir el potencial clonogénico de las UFC de blastocitos de LMA se debió a la inducción de diferenciación, se analizó la frecuencia de CD11b, un marcador de maduración granulocítica en las células de LMA del paciente en respuesta al tratamiento con tioridazina (Figura 10l). Se observó un aumento marcado en la frecuencia de las células de blastocitos de LMA granulocítica con una duración en el tratamiento (Figura 10l), que indica que la tioridazina exhibe su orientación específica de células LMA a través de la inducción de diferenciación. Este hallazgo es análogo a la inducción de diferenciación demostrada en CMPH neoplásicas (Figura 10a-f) y confirma la lectura robusta de esta plataforma de cribado hacia la identificación de agentes capaces de diferenciar las células neoplásicas. Este resultado también sugiere que la tioridazina puede representar el mejor candidato para el direccionamiento específico de CMC de LMA que requiere pruebas usando ensayos *in vivo* de xenoinjerto de ratón en humano.

#### 40 Ejemplo 10: La tioridazina reduce la función de CML mientras se evitan las CMPH normales

Para delinear si la inhibición de los blastocitos de LMA detectadas *in vitro* se debieron a los compuestos que afectan al compartimento de células madre neoplásicas, se llevaron a cabo estudios de xenotrasplante (Dick, 2008) que definen funcionalmente CML y células madre hematopoyéticas (CMH) (Figura 12). El tratamiento de CMPH con salinomicina (1  $\mu\text{M}$ ) redujo significativamente el injerto hematopoyético a niveles casi no detectables (Figura 13a) revelando que este compuesto interfiere con la hematopoyesis normal de CMPH y, por lo tanto, se excluyó de una evaluación adicional, ya que es poco probable que proporcione el anti-CMC terapéutico selectivo de direccionamiento deseado. Por el contrario, el tratamiento con mefloquina (10  $\mu\text{M}$ ) mostró una reducción ligera, incluso insignificante, en la capacidad CMH con respecto a los controles (Figura 12a). Sin embargo, la mefloquina demostró ser ineficiente en la reducción de la capacidad de CML de LMA y por lo tanto se descartó una evaluación adicional debido a la ausencia de efectos selectivos (Figura 12c).

En contraste con salinomicina y mefloquina, el tratamiento de CMPH con tioridazina 10  $\mu\text{M}$  mostró el mismo nivel de injerto de médula ósea (MO) (Figura 12a) y de injerto esplénico (Figura 13b) como células tratadas con vehículo de control. La capacidad de reconstitución del multilinaje fue idéntica a la de las CMH humanas tratadas con control y tioridazina con desarrollo mielóide (Figura 12b), linfóide (Figura 12b), eritroide (Figura 13d) y megacariocítico (Figura 13d) completamente no afectado. Como se midió mediante trasplante serial secundario, el tratamiento con tioridazina no afectó la autorrenovación de CMH en comparación con las muestras tratadas con control (Figura 13f). Sin embargo, en marcado contraste con la salinomicina y la mefloquina, el tratamiento con tioridazina fue capaz de reducir significativamente las CML de LMA iniciadores de la enfermedad leucémica (Figuras 12c-d; Figura 13c; Figura 13e). El cálculo de la relación de la regeneración hematopoyética normal de CMPH (%hCD45+) con respecto a la leucemogénesis de LMA (blastocitos% CD33+ hCD45+) reveló que la tioridazina redujo significativamente la función de CML mientras preserva la capacidad de CMH normal (Figura 12e). En ausencia de tioridazina, no se observó diferencia en el nivel de injerto leucémico de los receptores de trasplante secundario. Esto sugiere que la exposición continuada a este fármaco es necesaria para inhibir la leucemogénesis en receptores secundarios. Estos datos demuestran que la tioridazina se centra selectivamente en CMC somáticas, mientras que no tiene ningún



efecto sobre las propiedades de CM normales *in vivo*. Como se identificó a la tioridazina a través del uso de una nueva plataforma de cribado diferencial utilizando CMPH normales y neoplásicas *in vitro*, los efectos funcionales de la tioridazina proporcionan un ejemplo del valor predictivo del uso de las CMP humanas para comprender las CMC somáticas.

5

#### Ejemplo 11: Los receptores de dopamina demarcan CMC humanas

Se sabe que la tioridazina actúa a través de los receptores de dopamina (DR 1-5) (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Seeman y Lee, 1975). Para evaluar si el mecanismo de acción de la tioridazina interfiere selectivamente con CMC humanas frente a CM normales es a través del antagonismo de DR, se analizó la expresión de la superficie de células DR. Hasta la fecha, se han identificado cinco DR y se han dividido en receptores de la familia D<sub>1</sub> (D1 y D5) y de la familia D<sub>2</sub> (D2, D3 y D4) (Sibley y Monsma, 1992). Las CMPH normales que expresan el marcador pluripotente SSEA3 carecían de la expresión de DR (Figura 14a y Figuras 15a-b). Por el contrario, CMPH neoplásicas expresaron los cinco DR (Figura 14b). La expresión diferencial observada de los DR y la inhibición selectiva de tioridazina para CMPH neoplásicas sugieren que la inhibición de la señalización del DR puede jugar un papel en el direccionamiento selectivo de CMC humanas frente a CM normales.

Para ampliar el papel potencial de DR en CMC con base en el papel funcional del tratamiento con tioridazina, se examinó si el antagonismo de DR podría explicar la pérdida de la función de CML después del tratamiento con tioridazina. La expresión de DR1-5 se analizó en CMPH (Figura 14c) y en células mononucleares hematopoyéticas humanas de CB normal (Figuras 15c-f) y muestras de pacientes con LMA (Figura 14d y Figura 15g). No se observaron DR en las CMH primitivas o poblaciones progenitoras de CB (identificadas como las fracciones CD34+38- o CD34+38+, respectivamente (Bhatia et al., 1997)) (Figura 14c) indicando que las CMH y progenitores no expresan los objetivos para tioridazina. De manera similar, los DR no pudieron ser detectados en la superficie de células eritroides (Figura 15c), megacariocíticas (Figura 15c) y linfoides (Figura 15d). Sólo monocitos definidos como CD14+ y aproximadamente la mitad de la población de granulocitos definida como CD15+ expresaron los DR (Figuras 15e-f). Todas las 13 muestras de pacientes con LMA analizadas contenían una población de blastocitos DR+ con diferentes niveles de los cinco receptores (Figura 14d) y se detectaron predominantemente en células CD34+/CD14+ (Figura 15g). Sin embargo, a diferencia de las CMH normales, las células CD34+ no se correlacionan con la capacidad de CML en LMA humana (Taussig et al., 2008) y recientemente se han identificado en numerosas subfracciones desprovistas de CD34 o CD38 (Eppert et al., 2011). Las observaciones de la expresión diferencial de DR en muestras hematopoyéticas humanas normales y de LMA sugieren fuertemente que las CML de LMA humanas son heterogéneas y el direccionamiento del fármaco debe basarse en vías moleculares en lugar de predicciones de fenotipos sustitutos.

Aparte del tejido hematopoyético, se han identificado recientemente CMC somáticas y se han validado en tumores de mama humanos y tienen un fenotipo CD44+ CD24-/bajo (Al-Hajj et al., 2003). Usando tumores primarios de mama humano que son negativos para el receptor de estrógeno (ER-), receptor de progesterona (PR-) y receptor epidérmico humano 2 (HER2-) que están asociados con los resultados de pronóstico más pobre (Dent et al., 2007) se reveló la colocalización de DR en las CMC de mama CD44+ CD24-/bajo (n=3 pacientes) (Figuras 14e-f y Figura 15h). Este hallazgo es consistente con los bajos niveles de DR encontrados en el tejido mamario normal, mientras que los tumores benignos de mama muestran niveles intermedios y los cánceres de mama muestran altos niveles de estos receptores (Carlo, 1986). Se investigó si la expresión de DR en blastocitos de LMA se correlacionaba con la incidencia de CML en pacientes con LMA. Las muestras de LMA con una gran fracción de blastocitos de DRD3+ (Figura 14g) y blastocitos de DRD5+ (Figura 14h) contienen CML, ya que son capaces de iniciar la leucemia en receptores de xenotransplantes, a diferencia de muestras de pacientes con LMA con niveles significativamente menores de DR que no contienen CML. Las muestras de pacientes con LMA que contienen CML han sido correlacionadas con resultados pronósticos deficientes, mientras que las muestras sin CML demuestran un buen pronóstico (Eppert et al., 2011). Los altos niveles de expresión de DR se correlacionan con mal pronóstico mientras que los niveles bajos muestran un buen pronóstico (Figuras 14g-h), lo que sugiere que la evaluación de DR tiene aplicaciones de biomarcadores pronósticos y es menos compleja que las firmas moleculares o lecturas de CML para cada paciente con LMA. Basados en la identificación inicial en CMPH neoplásicas, estos resultados colectivos sugieren un papel potencialmente más generalizable para la expresión de DR en CMC somáticas humanas de lo previsto y validan DR como biomarcador candidato para otras CMC en humanos.

55

#### Ejemplo 12: El antagonismo de la tioridazina de la DR inhibe la LMA humana

Para comprender mejor el papel funcional de la DR en la LMA humana, se utilizaron dos líneas celulares de LMA derivadas de pacientes, LMA-OCI2 y LMA-OCI3 (Koistinen et al., 2001).

60

Al igual que las muestras primarias, estas dos líneas celulares revelaron expresión para cada DR1-5 (Figura 16a) con niveles claramente superiores a los observados en muestras de pacientes. Debido a la biodisponibilidad de dopamina en suero bovino fetal (FBS) (Little et al., 2002), se emplearon condiciones libres de suero para evaluar el papel de los DR en LMA. Ambas líneas de LMA se trataron con tioridazina y se compararon con otros antagonistas conocidos de DR, clozapina y clorpromazina (Seeman y Lee, 1975). Todos los tres antagonistas de DR redujeron el número de células de LMA después del tratamiento (Figura. 16b). Para evaluar adicionalmente la especificidad de la

65

DR dirigida a las células LMA humanas, las muestras de LMA del paciente se dividieron en subfracciones DR+ y DR- usando clasificación de células activadas por fluorescencia antes de ser tratadas con vehículo DMSO o tioridazina durante 24 horas y luego evaluadas para determinar el contenido de UFC de blastocitos. Sólo se observó una reducción en la generación de UFC de blastocitos en la subfracción de DR+ tratada con tioridazina (Figura 17a), mientras que no se observó reducción en la subfracción de DR- tratada con tioridazina (Figura 17b). Por el contrario, la adición de un agonista de la familia D2 de DR, 7OH-DPAT, aumentó el número de células de LMA (Figura 16c). La familia D2 y la familia D1 de DR ejercen acciones opuestas sobre la señalización intracelular que conduce a efectos biológicos diferenciales (Self et al., 1996). El tratamiento con un agonista de la familia D1 de DR, (SKF38393), dio como resultado una reducción significativa en el número de células de LMA que confirma que la señalización de la familia D2 es necesaria para la supervivencia de las células de LMA (Figura 16d). Estos resultados combinados sugieren que el mecanismo de la acción de la tioridazina es a través del antagonismo de las DR de la familia D2 y no debido a los efectos fuera del objetivo, e identifica una nueva vía de direccionamiento de CMC a través de la señalización de DR.

#### 15 Ejemplo ilustrativo 13: Análogos de tioridazina como agentes contra células madre de cáncer

La Figura 17 muestra un diagrama de dispersión de variantes de células madre neoplásicas (células v1O4, células v1H9-Oct4-GFP) tratadas con diferentes bibliotecas químicas para identificar compuestos activos, es decir, aquellos que indujeron una pérdida de pluripotencia (PDP, una medida basada en la detección de un informador de los niveles de Oct 4, que en este caso es una salida de señal de GFP) y una reducción en el recuento de células (por debajo de 750 células por imagen adquirida). Los compuestos que redujeron los recuentos de células por debajo de 100 se clasificaron como posiblemente tóxicos, pero dado que muchos agentes de quimioterapia actuales presentan efectos tóxicos similares, éstos pueden ser útiles como agentes contra células madre de cáncer.

25 En resumen, las células v1O4 se sembraron en placas de 96 pozos recubiertas con Matrigel (5000 células/pozo) que contenían medio acondicionado con fibroblastos embrionarios de ratón (MAFER) complementado con 8 ng/mL de FbCF y se trataron durante 72 horas con compuestos disueltos en DMSO. La concentración final de cada compuesto utilizado en el tratamiento fue 10  $\mu$ M o 1  $\mu$ M (n=3). Los pozos de control se trataron con DMSO al 0,1% (control bajo) o 100 ng/mL de BMP4 (control alto para inducir PDP). Al cabo de 72 horas, las células se fijaron, se tiñeron con Hoechst y se formaron imágenes mediante microscopía automática. La intensidad de GFP y la señal de Hoechst fueron cuantificados como medidas de PDP y el recuento de células, respectivamente, y los compuestos con un puntaje Z de más de 3 desviaciones estándar de la media para el recuento de células reducido y se escogieron PDP para un estudio más detallado.

35 La tioridazina se seleccionó para estudio adicional (Figura 17, estrella en un círculo punteado) así como otros seis compuestos con estructuras químicas similares (análogos de tioridazina) (Figura 17, estrellas en caja punteada). Los análogos de tioridazina identificados para estudio adicional incluyeron proclorperazina, trifluoperazina, flufenazina, perfenazina y triflupromazina. La similitud estructural de los análogos se determinó sobre la base de estos compuestos con un coeficiente de similitud de Tanimoto > 0,6 cuando se compara con tioridazina (calculado mediante el software IDBS SARView). Sorprendentemente, los análogos de tioridazina se representaron desproporcionadamente al causar una pérdida relativa en el recuento de células y una pérdida de pluripotencia en variantes de células madre neoplásicas (6/64 = 9%) en comparación con una frecuencia total de análogos de tioridazina presentes en todas las bibliotecas químicas (22/1594 = 1,4%), una diferencia mayor a seis veces. Esto sugiere que una característica estructural presente en la tioridazina y compuestos relacionados provoca una reducción en el número de células y PDP en células madre de cáncer neoplásico.

El compuesto relacionado con la fenotiazina, clorpromazina es citotóxico para varias líneas celulares de leucemia, así como para otros tipos de líneas celulares de cáncer, con una potencia comparable a la tioridazina. Sin embargo, la clorpromazina no tuvo un efecto comparable sobre las células v1O4 (Figura 17, estrella circular). Por consiguiente, el efecto de la clorpromazina depende de la célula que se expone y que tiene algunas propiedades anticancerígenas que no necesariamente implica que tiene amplia actividad contra todas las células cancerosas o células madre de cáncer.

#### 55 Ejemplo 14: Análogos de tioridazina con actividad en variantes de células madre neoplásicas no inducen muerte celular en líneas celulares de cáncer de LMA

Se han utilizado líneas celulares de cáncer en ensayos de cribado de alto rendimiento para identificar compuestos terapéuticos potenciales contra el cáncer. La viabilidad celular es una salida comúnmente utilizada para evaluar la actividad potencial contra el cáncer de un compuesto. Sin embargo, las terapias contra el cáncer que dependen únicamente de la inducción de la muerte celular pueden no representar el método más eficaz para erradicar las células madre del cáncer. La identificación de compuestos que se dirigen específicamente a células madre de cáncer e inducir su diferenciación podría representar otro tipo de terapia dirigida. La dificultad para identificar estos tipos de compuestos se debe en parte a la falta de sustitutos apropiados para las células madre del cáncer. Basándose en las características y propiedades caracterizadas de las variantes de células madre neoplásicas, son útiles para identificar compuestos contra el cáncer que no necesariamente inducen la muerte celular.

Dos observaciones demuestran la utilidad de las variantes de células madre neoplásicas en la identificación de compuestos que fueron o no fueron identificados como compuestos anticancerígenos por otros sistemas. Ambas observaciones están relacionadas con la respuesta de líneas celulares de cáncer de LMA, LMA-OCI2 y LMA-OCI3 a la tioridazina y análogos de tioridazina.

Anteriormente se demostró que la tioridazina reduce el número de células tanto en el LMA-OCI2 como en el LMA-OCI3 (véase, por ejemplo, la PCT/CA2010/000175). Las células LMA-OCI2 y LMA-OCI3 se trataron con tioridazina y las células se analizaron para detectar signos de muerte celular inducida por apoptosis. Como se muestra en la Figura 18, la tioridazina ejerce sus efectos sobre estas líneas celulares a través de la muerte celular, con igual eficacia frente a LMA-OCI2 y LMA-OCI3. Esto contrasta con los efectos inducidos por la diferenciación de la tioridazina en las variantes de células madre neoplásicas. Una demostración adicional de la utilidad de los procedimientos descritos en la presente invención se ilustra mediante la respuesta de las líneas celulares de cáncer a análogos de tioridazina. Las Figuras 17 y 18 mostraron que estos compuestos presentaban actividad similar a la tioridazina, incluyendo la capacidad para reducir el número de células y la pluripotencia en células v1, y producir respuestas de diferenciación similares. Sin embargo, los análogos de tioridazina no indujeron significativamente la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de LMA; estos análogos de tioridazina no habrían sido probablemente identificados en un cribado de viabilidad utilizando estas células.

Por consiguiente, el uso de los ensayos de cribado divulgados en la presente memoria que usan variantes de células madre neoplásicas son significativamente diferentes de otros procesos de cribado que usan líneas celulares de cáncer.

Ejemplo 15: Los compuestos identificados como compuestos anticancerígenos son raramente compuestos contra células madre de cáncer

Las bibliotecas químicas usadas para cribar células madre pluripotentes neoplásicas (células v1O4) contienen compuestos que se describen como agentes terapéuticos anticancerígenos conocidos o actuales. Muchos de estos productos terapéuticos contra el cáncer presumiblemente han mostrado toxicidad contra las líneas celulares de cáncer.

Se realizó una búsqueda con MetaDrug para fármacos de moléculas pequeñas con estructuras disponibles que se usan en el tratamiento de cánceres humanos ("neoplasias"). Esta búsqueda encontró 167 de dichos compuestos anticancerígenos a partir de las bibliotecas NIH, PWK, TOCRIS y CCC combinadas. Estos compuestos anticancerígenos se representaron como se muestra en la Figura 20 y sólo se identificó un pequeño subconjunto de ellos (5%) que tenían actividad contra variantes de células madre neoplásicas (células v1O4). Esto sugiere que la plataforma de cribado descrita en este documento, tal como se describe en el Ejemplo 16, es altamente estricta o está identificando compuestos anticancerígenos de una manera única. Además, es poco probable que los compuestos identificados como compuestos anticancerígenos sean agentes contra células madre de cáncer.

Ejemplo ilustrativo 16: Flujo de trabajo mejorado para la identificación de alto rendimiento de compuestos que selectivamente se dirigen a células madre de cáncer, pero no a células madre normales

Anteriormente, los presentes inventores describieron los efectos de la tioridazina sobre variantes de células madre neoplásicas y células madre H9 normales usando citometría de flujo cuantitativa para medir los niveles de Oct4 en ambos tipos de células después del tratamiento con tres concentraciones diferentes de tioridazina (véase el documento PCT/CA2010/000175). Sólo en la concentración más alta probada (10  $\mu$ M) hubo una diferencia significativa en la pérdida de pluripotencia (basada en la expresión de Oct4) entre las células v1 neoplásicas y H9 normales (PCT/CA2010/000175). Sin embargo, la citometría de flujo cuantitativa no es fácilmente susceptible al análisis de alto rendimiento.

Aquí, los inventores describen métodos mejorados de cribado para identificar y validar compuestos que selectivamente se dirigen a células madre de cáncer en comparación con células madre normales como se muestra en la Figura 21. Los inventores también han determinado que la siembra de células madre normales y variantes de células madre neoplásicas como densidades de siembra específicas como se muestra en la Figura 22 mejora el ensayo de cribado y permite la detección rápida y efectiva de agentes selectivos contra células madre de cáncer. Los ejemplos de compuestos candidatos identificados usando este procedimiento de cribado secundario se describen como que tienen actividad selectiva o alternativamente, se denominan como activos selectivos, como se muestra en la Figura 23.

La primera etapa en el proceso de cribado, el cribado primario, se muestra en la Figura 21, etapa 1 y también se describe en la Figura 17 y Ejemplo 13. En esta etapa inicial de cribado, los compuestos que reducen los conteos de variantes de células madre neoplásicas y causan una PDP se identifican como compuestos activos. Estos compuestos se someten a continuación a otro conjunto de análisis descritos en la Figura 21, etapa 2. Esta etapa representa una mejora respecto a los métodos de citometría de flujo cuantitativos previos para determinar la potencia del compuesto y detectar diferencias en la respuesta entre variantes de células madre neoplásicas y células madre normales. Se ensayan diluciones de 8 o 10 puntos para cada compuesto en variantes de células

madre neoplásicas (V1O4) y células madre normales (células H9) para generar curvas de respuesta a la dosis. Para cada compuesto, se extrapolan los valores de concentración efectivos para la reducción del 50% en los recuentos celulares (CE50) de las curvas de respuesta a la dosis de las células tratadas v1O4 y H9. Los datos de respuesta a la dosis se ajustaron con una ecuación de Hill de 4 parámetros para derivar CE50, pendientes, valores mínimos y máximos usando el software IDBS ActivityBase. Los valores de CE50 se utilizan entonces para calcular una relación de potencia de actividad selectiva (CE50 de H9/CE50 de v1O4). Un valor de relación por encima de 1 indica que el compuesto es más potente contra las células v1O4 que contra las células H9. Los valores de relación se utilizan entonces como base para identificar compuestos de alta actividad selectiva que podrían inducir potencialmente la diferenciación de células madre de cáncer, pero no células madre normales. El ensayo de un compuesto sobre las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales a una cantidad de diferentes concentraciones permite la generación de curvas de respuesta a la dosis y la identificación de compuestos que exhiben actividad selectiva que no puede ser identificada mediante cribado a una sola concentración o en un rango limitado de concentraciones. La eficacia de cada compuesto también se puede cuantificar mediante análisis si se deriva el valor *min* del ajuste de Hill de 4 parámetros. Una métrica alternativa para la actividad selectiva es una comparación de eficacia. EFICACIA selectiva = *Minajustado* de H9/*Minajustado* de v1O4.

Ejemplo ilustrativo 17: Compuestos contra células madre de cáncer identificados usando relaciones de alta selectividad

Se calcularon las relaciones de actividad de selectividad [CE50 (v1O4)/CE50 (H9)] como se discutió en el Ejemplo 15 para una serie de compuestos cribados utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Se seleccionó un valor de relación de 3 como umbral para identificar compuestos de alta actividad selectiva. Se espera que estos compuestos induzcan selectivamente la diferenciación/toxicidad en las células madre del cáncer, pero tienen efectos mínimos sobre las células madre normales. Los compuestos identificados usando el ensayo de cribado con las relaciones de actividad selectiva más elevadas se muestran en la Figura 23. Sorprendentemente, las relaciones de potencia de actividad selectiva para tioridazina y análogos de tioridazina eran demasiado bajas para ser incluidas en la Figura 23, lo que sugiere que los otros compuestos descritos en la presente memoria pueden tener una ventana terapéutica más grande.

Ejemplo ilustrativo 18: El análisis de curvas de respuesta a la dosis permite la identificación de agentes contra células madre de cáncer

La mayoría de los métodos primarios de cribado de alto rendimiento utilizan un único punto de concentración para interrogar la respuesta de un ensayo debido al tratamiento con un compuesto. La presente divulgación describe ensayos y condiciones para manipular variantes de células madre neoplásicas y células madre normales con el fin de desarrollar ensayos basados en células madre para identificar y validar compuestos como selectivos para células madre de cáncer. En particular, los métodos permiten la generación de curvas de respuesta a la dosis como se muestra en las Figuras 21 y 24. Los datos de estas curvas se utilizaron para distinguir las diferencias en la respuesta de variantes de células madre neoplásicas y células madre normales a compuestos con potencias variables.

La Figura 24A muestra 7 compuestos selectivos activos que podrían haberse identificado ensayando las células en un solo punto de concentración de 10  $\mu$ M. La Figura 24B muestra las curvas de respuesta a la dosis para los otros 12 compuestos selectivos activos. Basándose en un solo punto de concentración de 10  $\mu$ M, muchos de estos compuestos no se habrían considerado selectivos para las células madre de cáncer, tales como la 8-azaguanina, el parabendazol o el 31-8220. Como se muestra en el Ejemplo 17, estos 19 compuestos selectivos activos parecen tener aún mayor selectividad para las células madre de cáncer que la tioridazina.

Ejemplo ilustrativo 19: Algunos compuestos de alta actividad selectiva tienen una baja actividad de activación de respuesta al estrés p53.

La LMA se caracteriza por células hematopoyéticas neoplásicas que están bloqueadas en su capacidad para diferenciarse en células maduras. De forma similar, las variantes de células madre neoplásicas también son refractarias a las señales de diferenciación normales (véase Werbowetski-Ogilvie et al., 2009). Los agentes que pueden inducir la diferenciación de células progenitoras/madre neoplásica representan una estrategia prometedora para el tratamiento de ciertos cánceres. El tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (LPA) usado ácido todo-trans-retinoico (ATRA) y trióxido de arsénico son ejemplos de aplicaciones de esta estrategia. Se cree que estos compuestos erradican las células madre del cáncer que mantienen el cáncer induciendo la diferenciación.

Para identificar compuestos que demostraron tener alta selectividad (Figura 23) que son también eficientes en la inducción de la diferenciación, se analizaron variantes de células madre neoplásicas tratadas para detectar cambios en la respuesta al estrés citotóxico que depende de p53. Variantes de células madre neoplásicas (células v1O4) y células madre H9 normales fueron fijadas y teñidas para la expresión de p53 después del tratamiento con compuestos de actividad selectiva. El porcentaje de tinción de células v1O4 y células H9 positivas para p53 se graficó luego para cada compuesto como se muestra en la Figura 25. Los altos niveles de activación de p53 indicaron alta toxicidad celular. Aunque los compuestos de actividad selectiva causaron niveles variables de

activación de p53 tanto en células v1O4 como H9, las células v1O4 generalmente parecen ser más sensibles con respecto a las células H9 normales.

5 Los compuestos de alta actividad selectiva agrupados cerca de la esquina inferior izquierda no aumentaron significativamente la respuesta de estrés dependiente de p53 en células v1O4 y H9. Este grupo puede contener candidatos potenciales para compuestos que diferencian selectivamente las células v1O4. Se determinaron los niveles de p53 de variantes de células madre neoplásicas tratadas con tioridazina y análogos de tioridazina y también se muestran en la Figura 25 como puntos negros. Como se muestra en la Figura 25, los análogos de tioridazina aparecieron en esta misma esquina inferior izquierda, en consonancia con observaciones previas de que  
10 actuaban sobre variantes de células madre neoplásicas induciendo diferenciación.

Ejemplo 20 La tioridazina se dirige selectivamente a células madre de cáncer de mama que expresan receptores de dopamina.

15 Como se muestra en el Ejemplo 12, los receptores de dopamina (DR) se colocan en la fracción de células madre de cáncer (CMC) del tejido de cáncer de mama triplemente negativo primario. MDA-MB-231 es una línea celular derivada de un carcinoma de mama triplemente negativo que está altamente enriquecido por células que poseen el fenotipo CMC de mama identificado y aceptado, CD44+CD24-/bajo (Figura 26A) (Al-Hajj et al., 2003, Mani et al., 2008). La Figura 26B muestra que las CMC de mama coexpresan diferentes subtipos de DR. El tratamiento de las  
20 células con tioridazina dio lugar a una menor frecuencia de células que expresan DR de tipo D1 (DRD1) (Figura 26C). Esto fue acompañado por un aumento en la expresión de CD24 como se muestra en la Figura 26D, que es un determinante negativo para CMC de mama y asociado con la reducción de la capacidad de repoblación (Sleeman et al., 2006). Estos resultados demuestran que la tioridazina se dirige selectivamente a la población de CMC de mama que expresa DR, a través de diferenciación inducida y muerte celular y también es consistente con los datos de la  
25 Figura 10 y el Ejemplo 9 que muestran la diferenciación inducida por tioridazina de variantes de células madre neoplásicas humanas y blastocitos de LMA.

Ejemplo 21 Identificación de agentes selectivos contra células madre de cáncer usando un método de cribado de dos etapas.

30 La Figura 27 es un diagrama de dispersión que muestra los resultados del cribado de una biblioteca química usando un método de cribado en dos etapas para la detección de agentes selectivos contra células madre de cáncer. La etapa de cribado primario identificó compuestos con actividad contra células madre de cáncer (agentes de prueba) basados en su capacidad para inducir una pérdida de pluripotencia (PDP) y disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas (todos los compuestos por debajo de la línea discontinua en la Figura  
35 27). Esta primera etapa ayuda a identificar compuestos que pueden estar dirigidos a las propiedades de rigurosidad (o autorrenovación) de las células madre del cáncer. El diagrama de dispersión muestra las diversas propiedades de la biblioteca de compuestos probada, ya que algunos compuestos indujeron PDP con una reducción moderada en el número de células, mientras que otros compuestos indujeron PDP con un alto nivel de citotoxicidad. En general, los compuestos más citotóxicos parecían tener una mayor inducción de PDP. El direccionamiento de agentes que inducen tanto la pérdida de pluripotencia como una reducción en el recuento de células da como resultado una mayor proporción de agentes que se identifican como agentes selectivos contra células madre de cáncer en la segunda etapa del método de cribado. La siguiente etapa del método en dos etapas implicó la identificación de agentes contra células madre de cáncer que se dirigen selectivamente y reducen los recuentos celulares de  
40 variantes de células madre neoplásicas y no de células madre normales, ensayando los agentes de prueba a una pluralidad de concentraciones de prueba y opcionalmente determinar los valores de CE50. Los compuestos que superan un valor de relación de selectividad predeterminado se enumeran en la Figura 23 como compuestos selectivos activos y se muestran como estrellas negras en la Figura 27.

50 Aunque se ha descrito la presente divulgación con referencia a lo que actualmente se considera que son los ejemplos preferidos, debe entenderse que la divulgación no está limitada a los ejemplos descritos.

Referencias:

55 Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25, 803-816.

60 Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 3983-3988.

Beaulieu, J. M., and Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63, 182-217.

- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., and Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40, 499-507.
- 5 Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5320-5325.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- 10 Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- 15 Breitman, T. R., Collins, S. J., and Keene, B. R. (1981). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* 57, 1000-1004.
- Breitman, T. R., Selonick, S. E., and Collins, S. J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2936-2940.
- 20 Burnett, A. K., Hills, R. K., Green, C., Jenkinson, S., Koo, K., Patel, Y., Guy, C., Gilkes, A., Milligan, D. W., Goldstone, A. H., et al. (2010). The impact on outcome of the addition of all-trans retinoic acid to intensive chemotherapy in younger patients with nonacute promyelocytic acute myeloid leukemia: overall results and results in genotypic subgroups defined by mutations in NPM1, FLT3, and CEBPA *Blood* 115, 948-956.
- 25 Carlo, R. D., Muccioli, G., Bellussi, G., Portaleone, P., Ghi, P., Racca, S. and Carlo, F. D. (1986). Steroid, Prolactin, and Dopamine Receptors in Normal and Pathologic Breast Tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences* 464, 559-562.
- 30 Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 102, 906-915.
- Dalton, S. O., Johansen, C., Poulsen, A. H., Norgaard, M., Sorensen, H. T., McLaughlin, J. K., Mortensen, P. B., and Friis, S. (2006). Cancer risk among users of neuroleptic medication: a population-based cohort study. *Br J Cancer* 95, 934-939.
- 35 Dalton, S. O., Mellekjaer, L., Thomassen, L., Mortensen, P. B., and Johansen, C. (2005). Risk for cancer in a cohort of patients hospitalized for schizophrenia in Denmark, 1969-1993. *Schizophr Res* 75, 315-324.
- 40 Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13, 4429-4434.
- 45 Desbordes, S. C., Placantonakis, D. G., Ciro, A., Socci, N. D., Lee, G., Djaballah, H., and Studer, L. (2008). Highthroughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 602-612.
- Diallo, J. S., Le Boeuf, F., Lai, F., Cox, J., Vaha-Koskela, M., Abdelbary, H., MacTavish, H., Waite, K., Falls, T., Wang, J., et al. (2010). A high-throughput pharmacoviral approach identifies novel oncolytic virus sensitizers. *Mol Ther* 18, 1123-1129.
- 50 Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.
- Dick, J. E. (2009). Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* 27, 44-46.
- 55 Driver, J. A., Logroscino, G., Buring, J. E., Gaziano, J. M., and Kurth, T. (2007). A prospective cohort study of cancer incidence following the diagnosis of Parkinson's disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1260-1265.
- 60 Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E. R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K. H., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., et al. (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine* doi:10.1038/nm.2415.
- Estey, E., and Dohner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368, 1894-1907.
- 65 Fibach, E., Hayashi, M., and Sachs, L. (1973). Control of normal differentiation of myeloid leukemic cells to macrophages and granulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 343-346.

- Frese, K. K., and Tuveson, D. A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7, 645-658.
- 5 Friend, C., Scher, W., Holland, J. G., and Sato, T. (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus- induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 68, 378-382.
- Guan, Y., Gerhard, B., and Hogge, D. E. (2003). Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (LMA). *Blood* 101, 3142-3149.
- 10 Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., and Lander, E. S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138, 645-659.
- Hotta, A., Cheung, A. Y., Farra, N., Vijayaragavan, K., Seguin, C. A., Draper, J. S., Pasceri, P., Maksakova, I. A., Mager, D. L., Rossant, J., et al. (2009). Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods* 6, 370-376.
- 15 Inglese, J., Shamu, C. E., and Guy, R. K. (2007). Reporting data from high-throughput screening of small-molecule libraries. *Nat Chem Biol* 3, 438-441.
- 20 Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300.
- Jordan, C. T. (2009). Cancer stem cells: controversial or just misunderstood? *Cell Stem Cell* 4, 203-205.
- 25 Koistinen P et al., Regulation of the acute myeloid leukemia cell line OCI/LMA-2 by endothelial nitric oxide synthase under the control of a vascular endothelial growth factor signaling system. *Leukemia*. 2001 Sep; 15(9): 1433-41.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., and Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- 30 Lee, J. Y., Nakada, D., Yilmaz, O. H., Tothova, Z., Joseph, N. M., Lim, M. S., Gilliland, D. G., and Morrison, S. J. (2010). mTOR activation induces tumor suppressors that inhibit leukemogenesis and deplete hematopoietic stem cells after Pten deletion. *Cell Stem Cell* 7, 593-605.
- 35 Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M. F., Hilsenbeck, S. G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G. C., et al. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100, 672-679.
- 40 Little, K. Y., Elmer, L. W., Zhong, H., Scheys, J. O., and Zhang, L. (2002). Cocaine induction of dopamine transporter trafficking to the plasma membrane. *Mol Pharmacol* 61, 436-445.
- Machalinski B, Wiszniewska B, Baskiewicz M, Marchlewicz M, Majka M, Wenda-Rózewicka L, Ratajczak MZ. (1998) In vivo and in vitro studies on the toxicity of Hoechst 33342 (Ho342). Implications for employing Ho342 for the isolation of haematopoietic stem cells. *Ann Transplant*.3(3): 5-13
- 45 Mani et al (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-15
- Nasr, R., Guillemain, M. C., Ferhi, O., Soilihi, H., Peres, L., Berthier, C., Rousselot, P., Robledo- Sarmiento, M., Lallemand-Breitenbach, V., Gourmel, B., et al. (2008). Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med* 14, 1333-1342.
- 50 Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- 55 Niu, C., Yan, H., Yu, T., Sun, H. P., Liu, J. X., Li, X. S., Wu, W., Zhang, F. Q., Chen, Y., Zhou, L., et al. (1999). Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 94, 3315-3324.
- 60 Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.
- 65 Raj, L., Ide, T., Gurkar, A. U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N. J., Golub, T. R., Carr, S. A., Shamji, A. F., et al. (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 475, 231-234.

- Recher, C., Beyne-Rauzy, O., Demur, C., Chicanne, G., Dos Santos, C., Mas, V. M., Benzaquen, D., Laurent, G., Huguet, F., and Payrastre, B. (2005). Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 105, 2527-2534.
- 5 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Sachs, L. (1978a). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature* 274, 535-539.
- 10 Sachs, L. (1978b). The differentiation of myeloid leukaemia cells: new possibilities for therapy. *Br J Haematol* 40, 509-517.
- 15 Sanz, M. A. (2006). Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 147-155.
- Sanz, M. A., Grimwade, D., Tallman, M. S., Lowenberg, B., Fenaux, P., Estey, E. H., Naoe, T., Lengfelder, E., Buchner, T., Dohner, H., et al. (2009). Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 113, 1875-1891.
- 20 Seeman, P., and Lee, T. (1975). Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 188, 1217-1219.
- 25 Self, D. W., Barnhart, W. J., Lehman, D. A., and Nestler, E. J. (1996). Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists. *Science* 271, 1586-1589.
- Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 6, 813-823.
- 30 Sibley, D. R., and Monsma, F. J., Jr. (1992). Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13, 61-69.
- Sleeman et al (2006) CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* 8: R7
- 35 Smith, B. D., Levis, M., Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K. M., Dausies, T., Allebach, J., and Small, D. (2004). Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 103, 3669-3676.
- 40 Smith, T. J., Khatcheressian, J., Lyman, G. H., Ozer, H., Armitage, J. O., Balducci, L., Bennett, C. L., Cantor, S. B., Crawford, J., Cross, S. J., et al. (2006). 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 24, 3187-3205.
- 45 Taussig, D. C., Miraki-Moud, F., Anjos-Afonso, F., Pearce, D. J., Allen, K., Ridler, C., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S. G., et al. (2008). Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 112, 568-575.
- Tefferi et al. *Cancer*, September 1st, pp. 3842-3847 (2009) Vannucchi et al. *Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms CA Cancer J. Clin.* 2009; 59:171-191
- 50 Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumors: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- 55 Wang, Z. Y., and Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111, 2505-2515.
- Werbowetski-Ogilvie, T. E., Bosse, M., Stewart, M., Schnerch, A., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Wynder, T., Smith, M. J., Dingwall, S., Carter, T., et al. (2009). Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol* 27, 91-97.
- 60 Xu, R. H., Chen, X., Li, D. S., Li, R., Addicks, G. C., Glennon, C., Zwaka, T. P., and Thomson, J. A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 20, 1261-1264.
- 65 Yilmaz, O. H., Valdez, R., Theisen, B. K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., and Morrison, S. J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 441, 475-482.



- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.
- 5 Yoshida, H., Kitamura, K., Tanaka, K., Omura, S., Miyazaki, T., Hachiya, T., Ohno, R., and Naoe, T. (1996). Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all- trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 2945-2948.
- 10 Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Hadjimitova, V., Ishikawa, M., Shinohara, Y., and Baba, Y. (2004). Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. *Phenothiazines and leukemia. Cancer Chemother Pharmacol* 53, 267-275.
- Zheng, R., Friedman, A. D., and Small, D. (2002). Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations. *Blood* 100, 4154-4161.
- 15 Zhu, J., Koken, M. H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M. K., Degos, L., Wang, Z. Y., Chen, Z., and de The, H. (1997). Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3978-3983.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar y validar un agente de prueba como un agente selectivo de células madre anticáncer, comprendiendo el método:
- 5
- i) poner en contacto una o más variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba y una o más células madre normales con el agente de prueba;
- 10
- ii) detectar un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente de prueba, y detectar un cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al agente de prueba;
- 15
- iii) identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madre de cáncer si el contacto con el agente de prueba induce una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas sin inducir una disminución comparable en las células madre normales; y opcionalmente
- 20
- iv) poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas y las células madre normales con el agente de prueba en una pluralidad de concentraciones de prueba y detectar un cambio en el recuento de células para una o más variantes de células madre neoplásicas y para las células madre normales en la pluralidad de las concentraciones de prueba;
- 25
- en donde el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de poner en contacto las células con el agente de prueba y se detecta el cambio en el recuento de células para las células madre normales entre aproximadamente 4 días y 6 días después de poner en contacto las células con el agente de prueba.
- 30
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además antes de la etapa i) detectar un cambio en la pluripotencia y un cambio en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con el agente y seleccionar un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y/o una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas.
- 35
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la pluralidad de concentraciones de prueba varía en al menos aproximadamente 3, 4 o 5 órdenes de magnitud, o donde la pluralidad de concentraciones varía al menos desde aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$  hasta 2  $\mu\text{M}$  o al menos desde aproximadamente 10 nM hasta aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , o donde la pluralidad de concentraciones de prueba comprende al menos una serie de diluciones de 8 puntos.
- 40
4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la etapa de identificar el agente de prueba como un agente selectivo contra células madres de cáncer comprende comparar una curva de respuesta a la dosis para el cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al contacto con el agente de prueba a la pluralidad de concentraciones de prueba a una curva de respuesta a la dosis para el cambio en el recuento de células de las células madre normales en respuesta al contacto con el agente de prueba a la pluralidad de concentraciones de prueba, opcionalmente puede comprender además determinar para el agente de prueba un valor concentración efectiva máxima para el 50% (CE50) para la disminución en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas y un valor de CE50 para la disminución en el recuento de células en las células madre normales, opcionalmente puede comprender además la determinación de una relación del valor de CE50 para la disminución en el recuento de células para las células madre normales en relación con el valor de CE50 para la disminución en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas, opcionalmente en donde el agente de prueba puede identificarse como un agente selectivo contra células madre de cáncer si la relación de los valores de CE50 es mayor que 3.
- 45
- 50
5. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que las variantes de células madre neoplásicas se siembran en un primer receptáculo hasta aproximadamente 3.000 a 7.000 células por receptáculo y las células madre normales se siembran en un segundo receptáculo hasta aproximadamente 8.000 a 12.000 células por receptáculo, opcionalmente en donde las variantes de células madre neoplásicas se siembran a razón de aproximadamente 4.000 a 6.000 células por receptáculo, opcionalmente alrededor de 5.000 células por receptáculo, opcionalmente en donde las células madre normales se siembran a razón de aproximadamente 9.000 a 11.000 células por receptáculo, opcionalmente alrededor de 10.000 células por receptáculo.
- 55
- 60
6. El método de la reivindicación 5, en el que el primer receptáculo y el segundo receptáculo son pozos en la misma placa de microtitulación o pozos en placas de microtitulación separadas, opcionalmente en donde la placa de microtitulación es una placa de microtitulación de 96 pozos, opcionalmente una placa de microtitulación recubierta de 96 pozos.
- 65
7. El método de la reivindicación 1, en el que el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 72 horas después de ponerse en contacto las células con el agente

- de prueba y se detecta el cambio en el recuento de células para las células madre normales entre aproximadamente 5 días después de poner en contacto las células con el agente de prueba; o el método de la reivindicación 2, en el que el cambio en el recuento de células para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre aproximadamente 48 horas y 96 horas después de ponerse en contacto las células con el agente de prueba,
- 5 opcionalmente aproximadamente 72 horas, y el cambio en el recuento de células para células madre normales se detecta entre aproximadamente 4 días y 6 días después de poner en contacto las células con el agente de prueba, opcionalmente aproximadamente 5 días, y el cambio en pluripotencia para las variantes de células madre neoplásicas se detecta entre 48 y 96 horas después de poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba, opcionalmente aproximadamente 72 horas después de poner en contacto las
- 10 variantes de células madre neoplásicas con el agente de prueba.
8. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las variantes de células madre neoplásicas son células madre pluripotentes humanas transformadas (CMPht) o células madre pluripotentes inducidas transformadas (CMPit).
- 15
9. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las células madre normales son células madre pluripotentes, o células madre pluripotentes inducidas, o células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos.
- 20
10. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además el cribado del agente de prueba identificado como un agente selectivo contra células madre de cáncer por la actividad en una línea celular de cáncer derivada de un sujeto con cáncer, opcionalmente en donde la línea celular de cáncer es una línea celular leucémica, opcionalmente una línea celular de leucemia mieloide aguda (LMA).
- 25
11. El método de la reivindicación 10, en el que la actividad es citotoxicidad, inducción de apoptosis, pérdida de pluripotencia, inducción de diferenciación, o combinaciones de los mismos.
- 30
12. El método de la reivindicación 1, que comprende además antes de la etapa i) cribar uno o más agentes para identificar uno o más agentes de prueba que inducen pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de variantes de células madre neoplásicas, que comprende opcionalmente antes de la etapa i) poner en contacto las variantes de células madre neoplásicas con el agente, detectar un cambio en la pluripotencia y un cambio en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas en respuesta al agente y seleccionar un agente como agente de prueba si el agente induce una pérdida de pluripotencia y una disminución en el recuento de células de las variantes de células madre neoplásicas, opcionalmente en donde las variantes de células madre neoplásicas se ponen en contacto con el agente a aproximadamente 10  $\mu$ M.
- 35
13. El método de la reivindicación 12, en el que se criban una pluralidad de agentes en una placa de microtitulación y se identifican como agentes de prueba con base en una desviación estándar umbral de la media, opcionalmente un umbral de una puntuación Z de al menos 3 desviaciones estándar respecto a la media, opcionalmente a partir de la media en toda la placa para el cambio en la pluripotencia y el cambio en el recuento de células.
- 40
14. El método de la reivindicación 12, en el que se usan variantes de células madre neoplásicas tratadas con proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) para inducir pérdida de pluripotencia como control positivo, opcionalmente en donde las células se tratan con al menos 100 ng/mL de BMP4.
- 45
15. El método de la reivindicación 12, en el que se detecta el cambio en pluripotencia de las variantes de células madre neoplásicas detectando un cambio en el nivel de expresión de uno o más marcadores de pluripotencia, opcionalmente en donde la detección de la expresión de uno o más marcadores de pluripotencia comprende el uso de anticuerpos selectivos para uno o más marcadores de pluripotencia, opcionalmente en donde la expresión de uno o más marcadores de pluripotencia en una o más variantes de células madre neoplásicas está operativamente unida a un gen informador, opcionalmente en donde el marcador de pluripotencia se selecciona entre Oct4 y Sox2, opcionalmente donde el marcador de pluripotencia se selecciona entre Oct4, Sox2, Nanog, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, receptor de IGF1, conexina 43, E-caderina, fosfatasa alcalina, REX1, CRIPTO, CD24, CD90, CD29, CD9 y CD49f, y mezclas de los mismos.
- 50
- 55

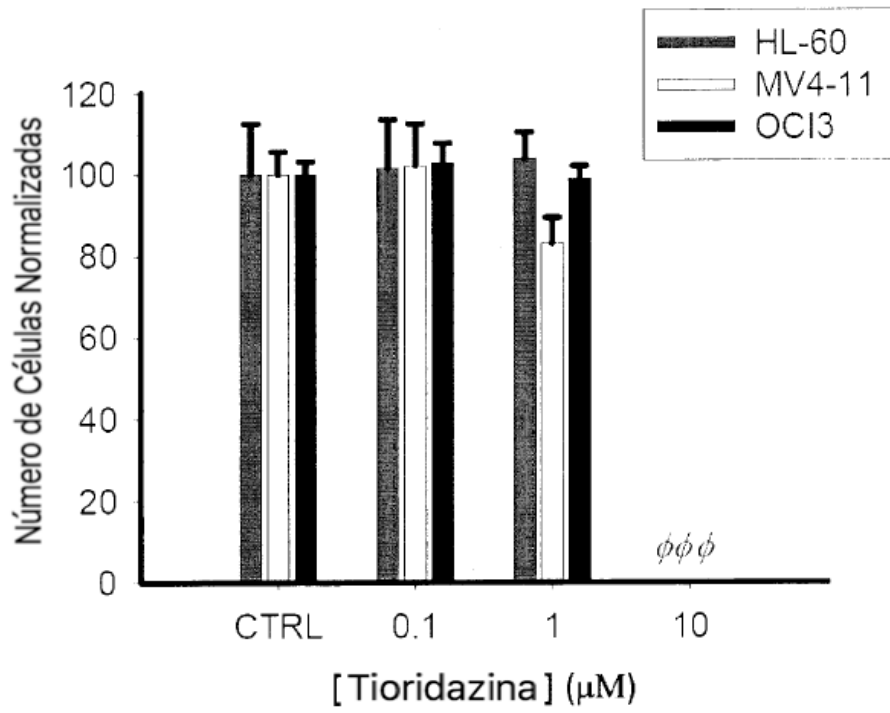
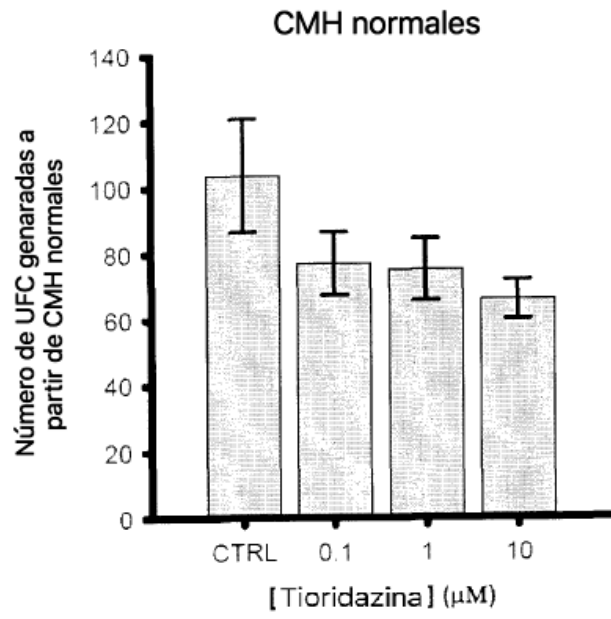
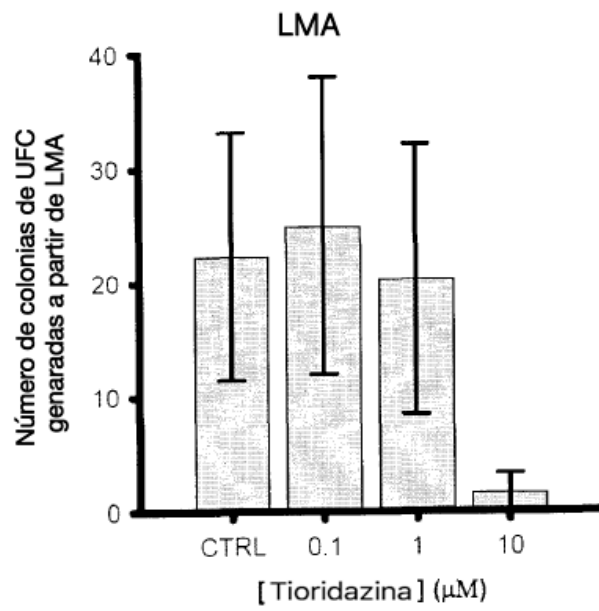


FIG. 1

**A**



**B**



**FIG. 2**

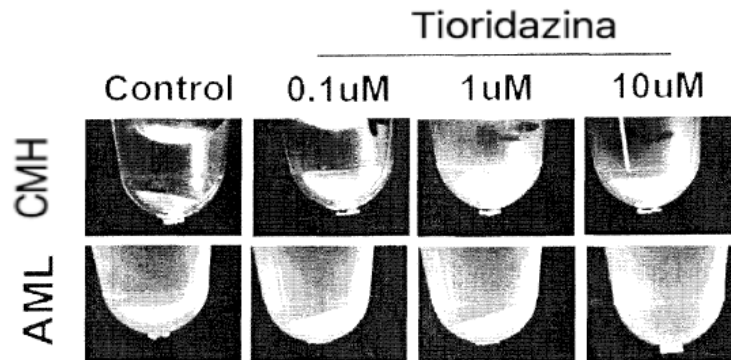
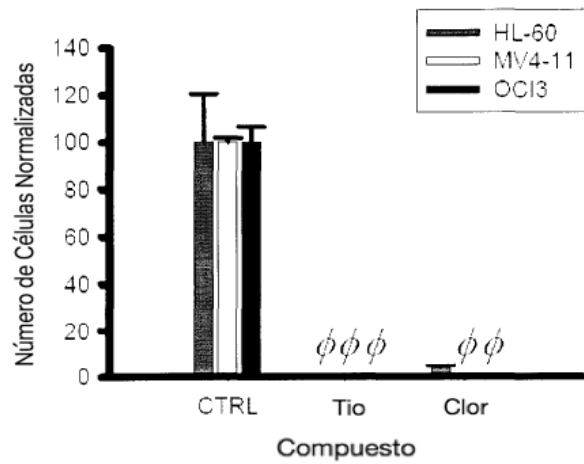


FIG. 3



Tio = Tioridazina 10 uM  
 Clor = Clorpromazina 10 uM

FIG. 4

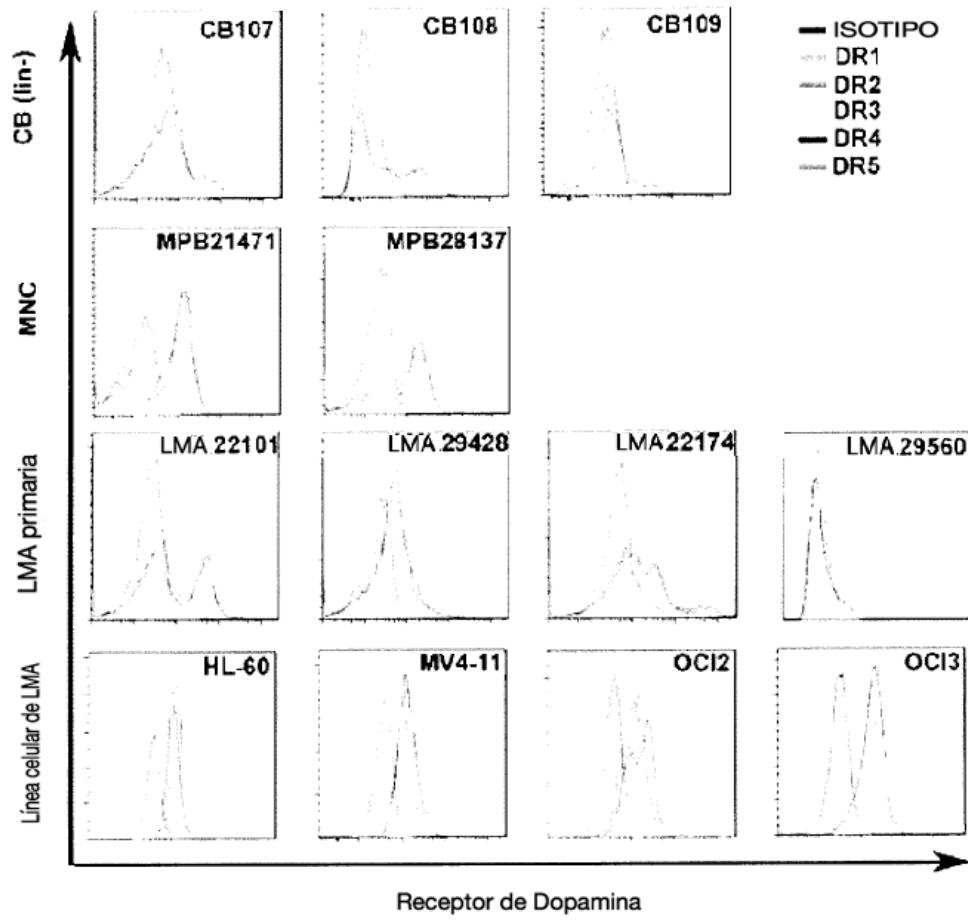


FIG. 5

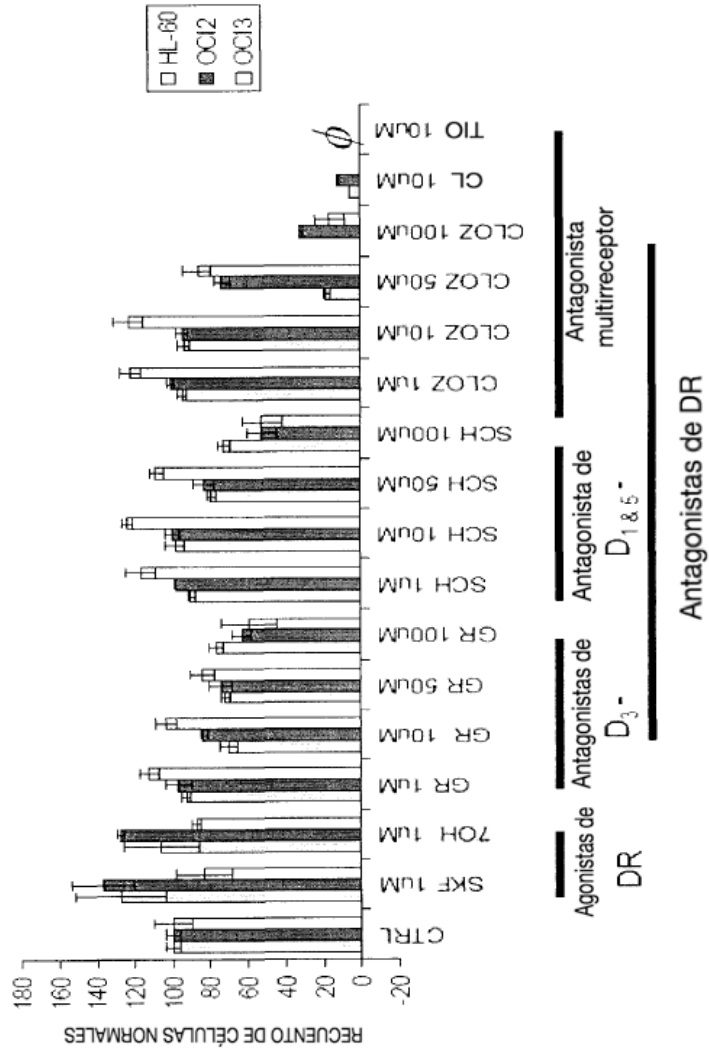


FIG. 6



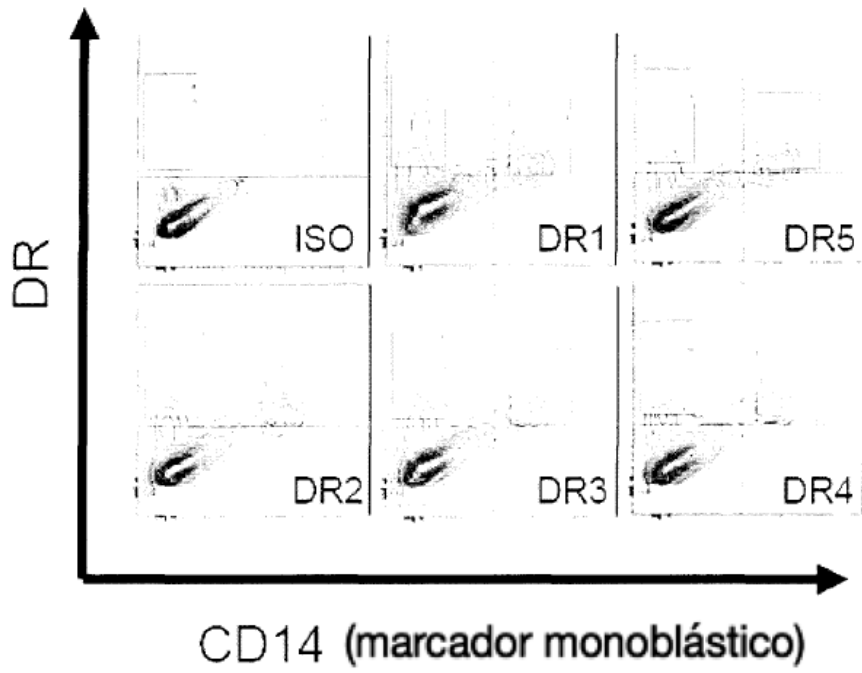


FIG. 7

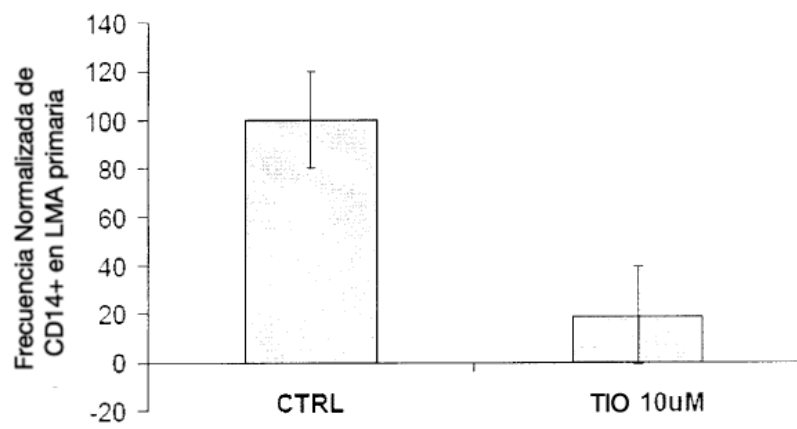


FIG. 8

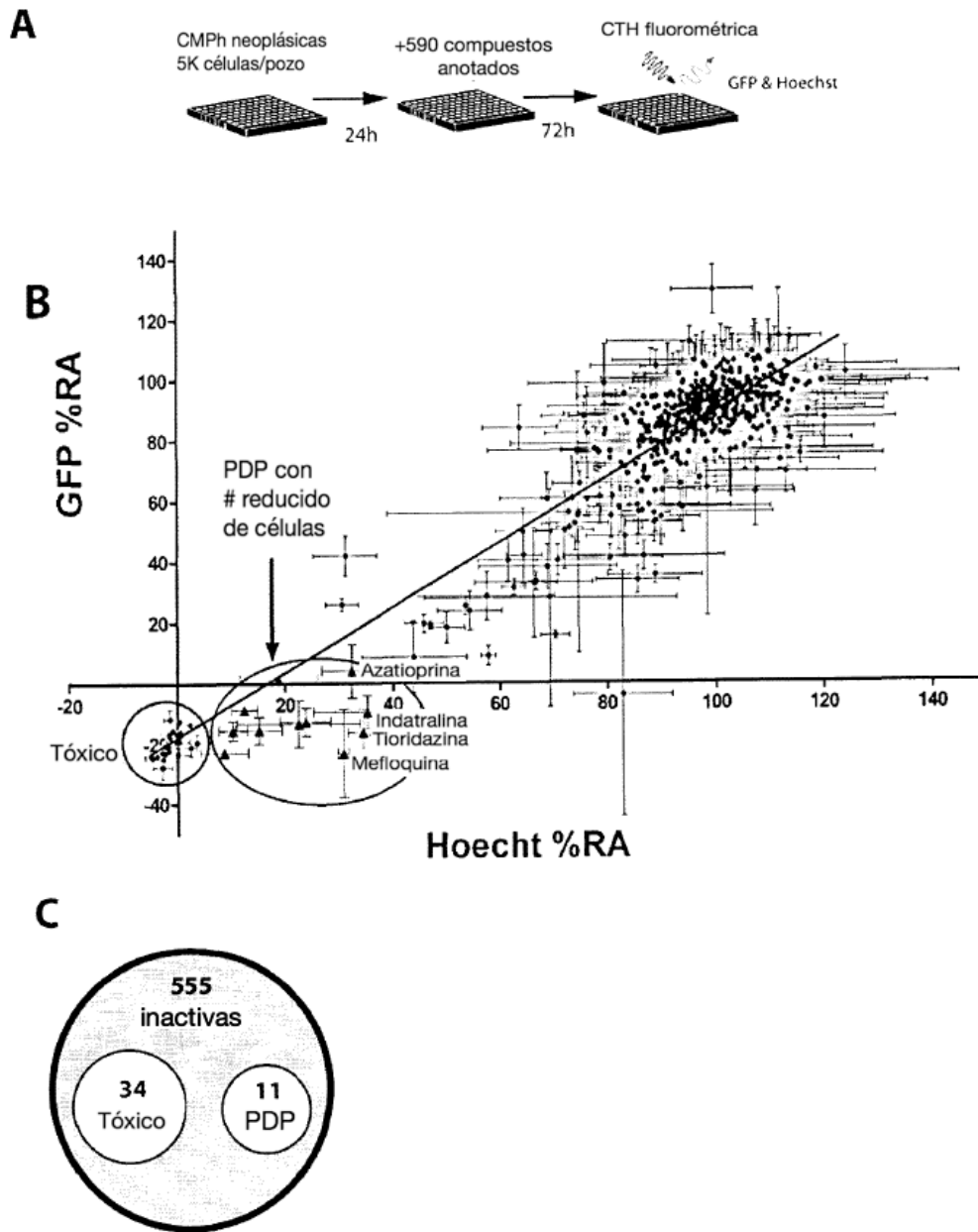


FIG. 9

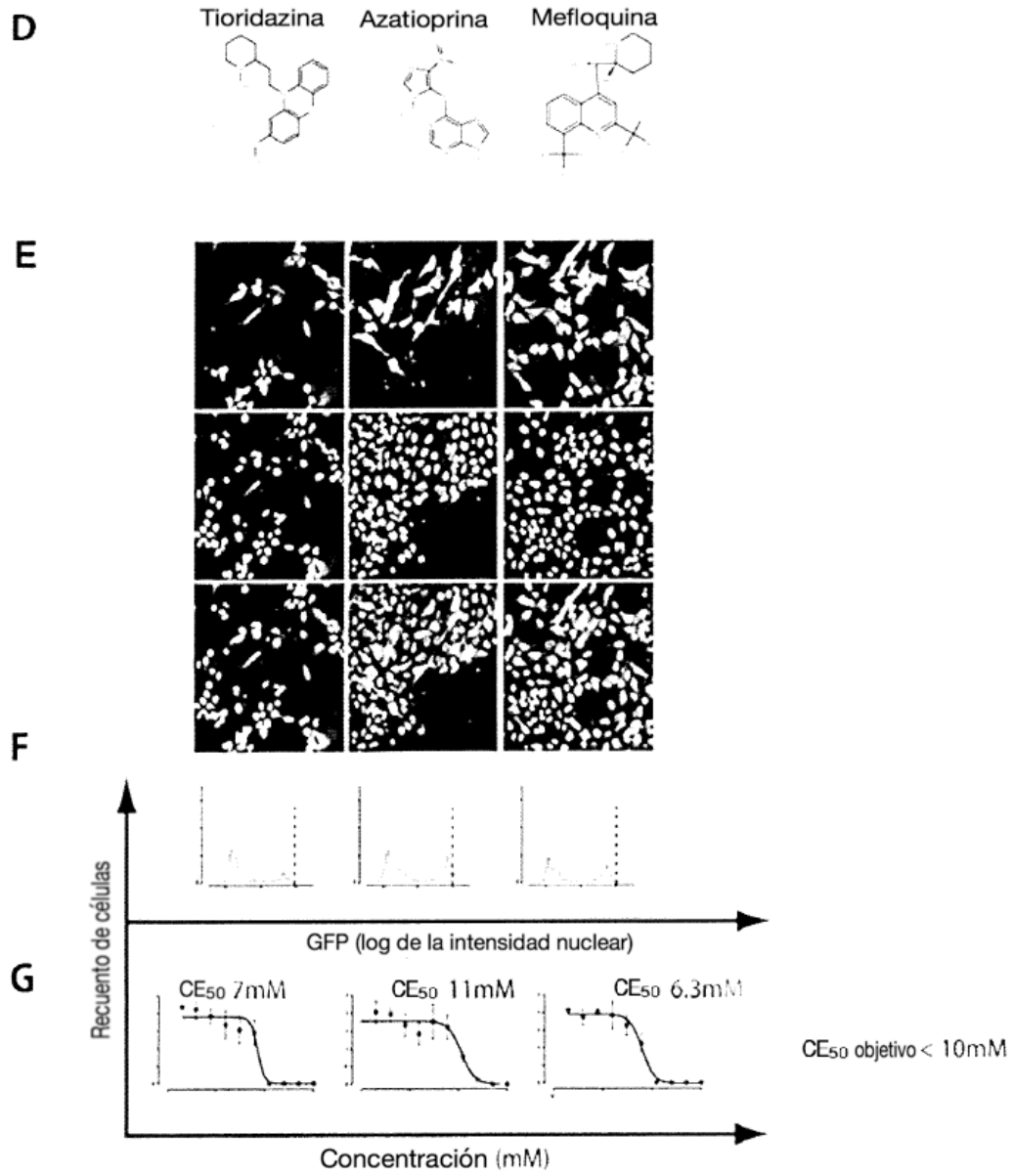


FIG. 9 (CONTINUACIÓN)

**A**

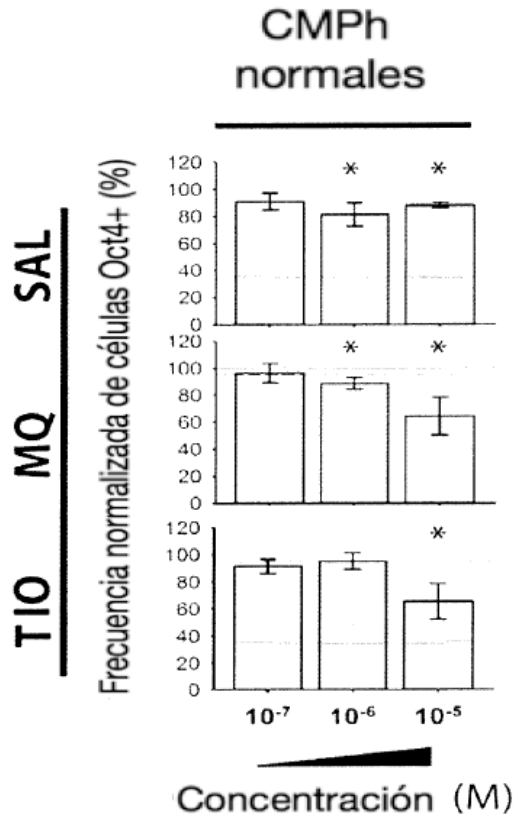


FIG. 10

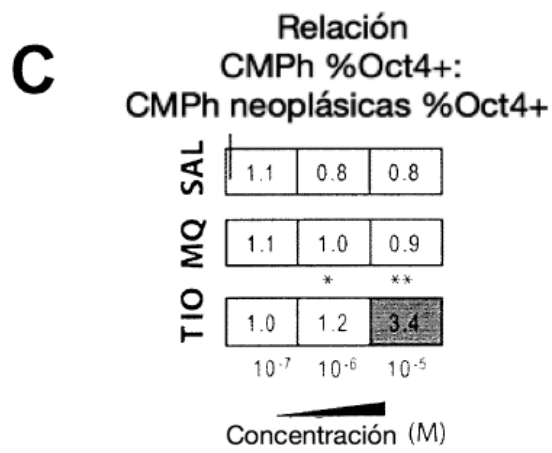
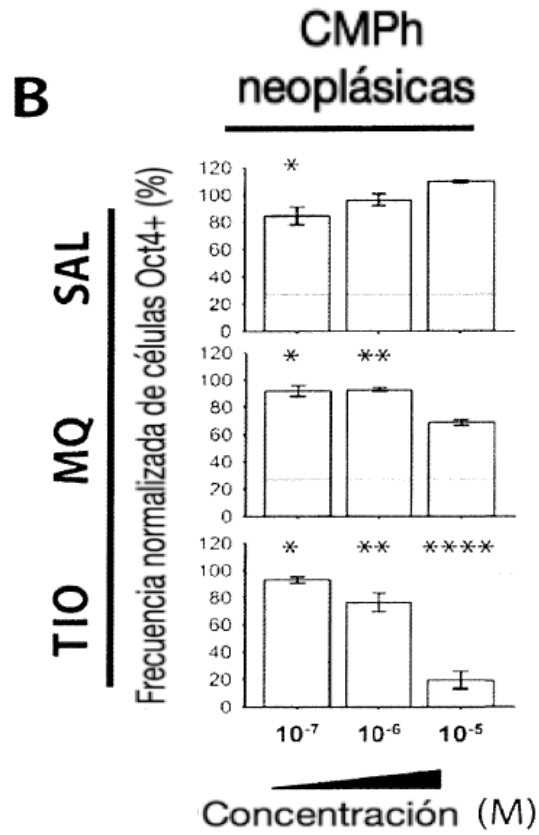
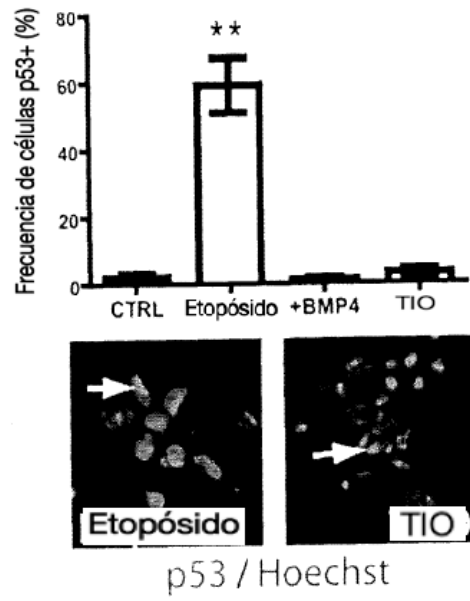


FIG. 10 (CONTINUACIÓN)

**D**



**E**

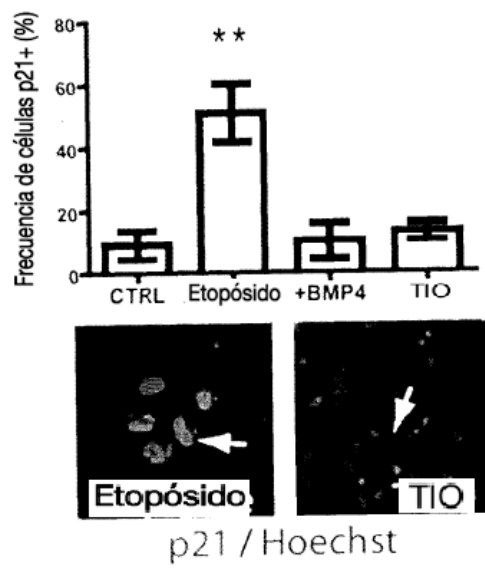


FIG. 10 (CONTINUACIÓN)

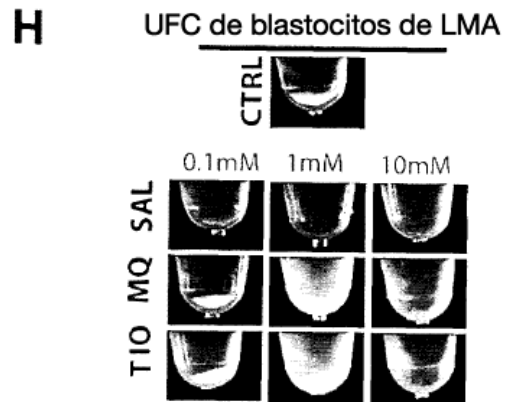
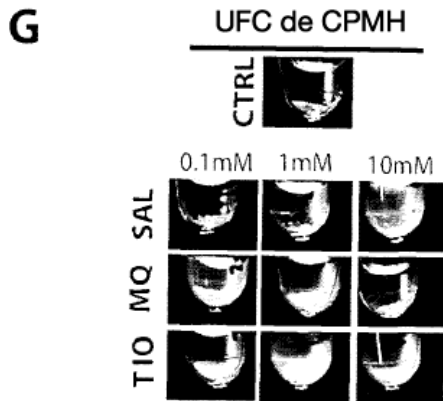
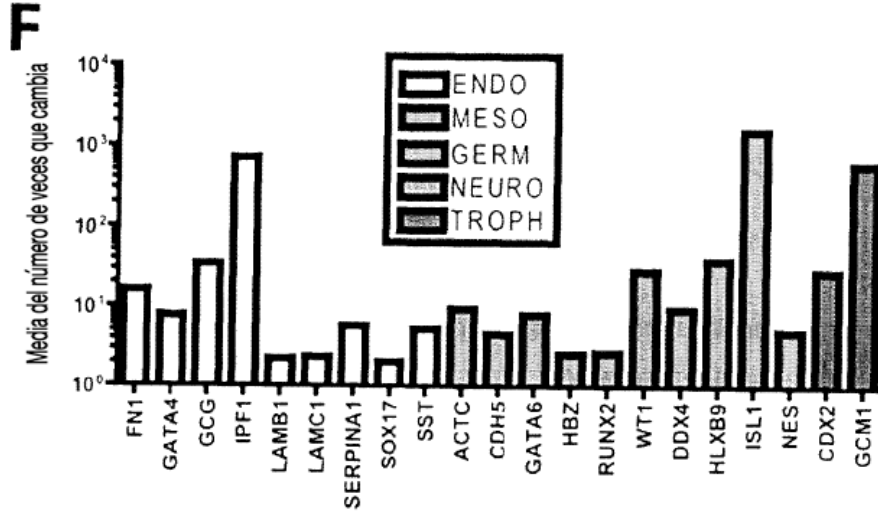
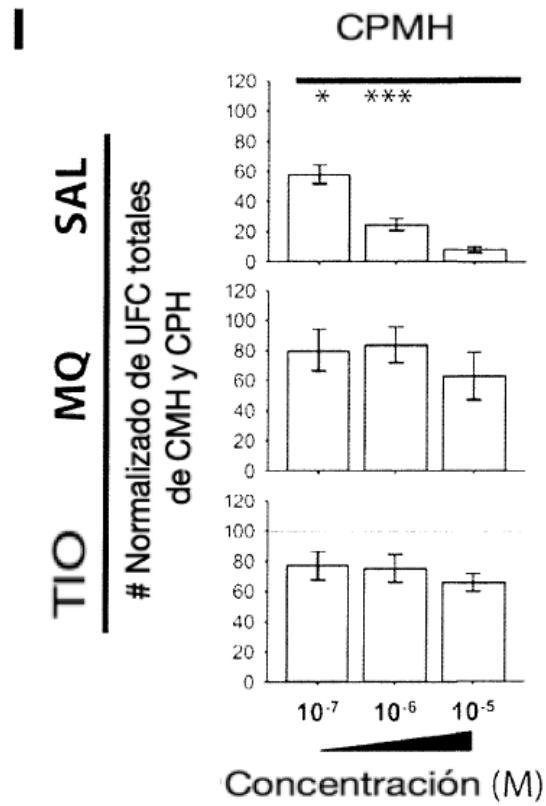


FIG. 10 (CONTINUACIÓN)





**K**

Relación  
UFC de CPMH:  
UFC de blastocitos de LMA

SAL	1.1	2.6	∅
MQ	1.0	0.9	1.6
TIO	0.7	0.8	3.6
	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>

Concentración (M)

FIG. 10 (CONTINUACIÓN)

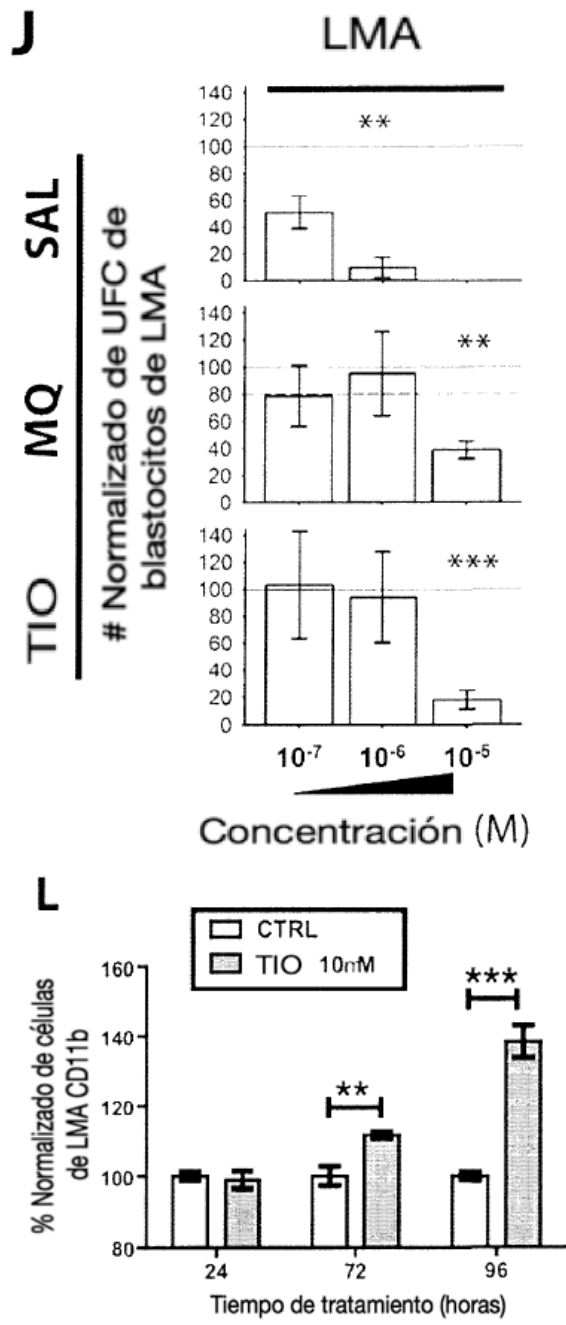


FIG. 10 (CONTINUACIÓN)

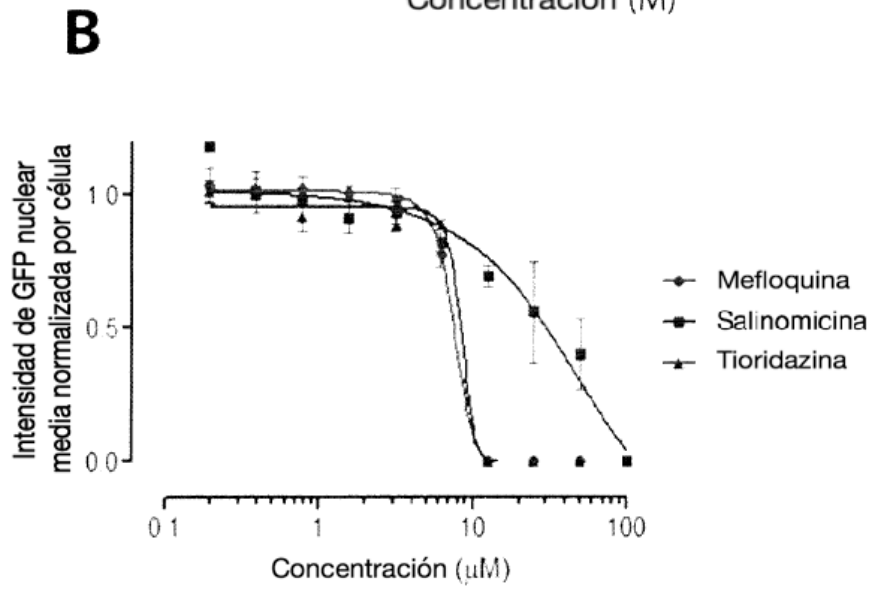
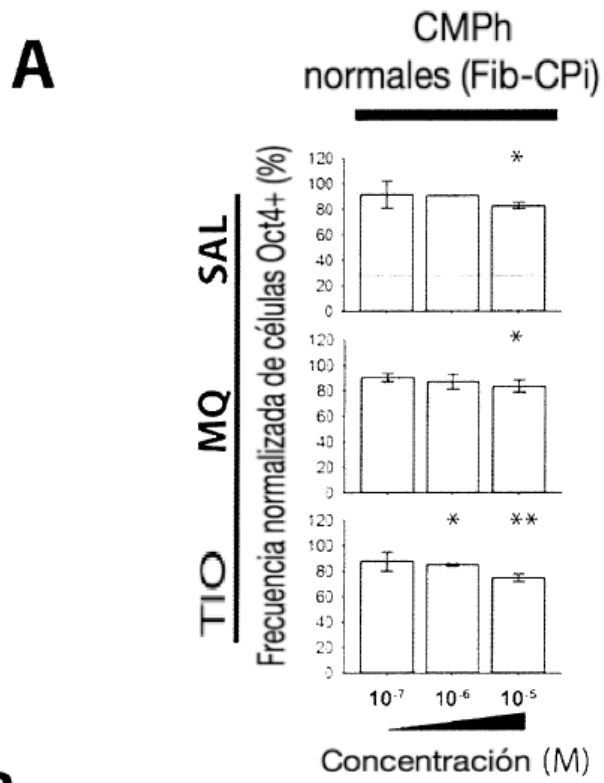


FIG. 11

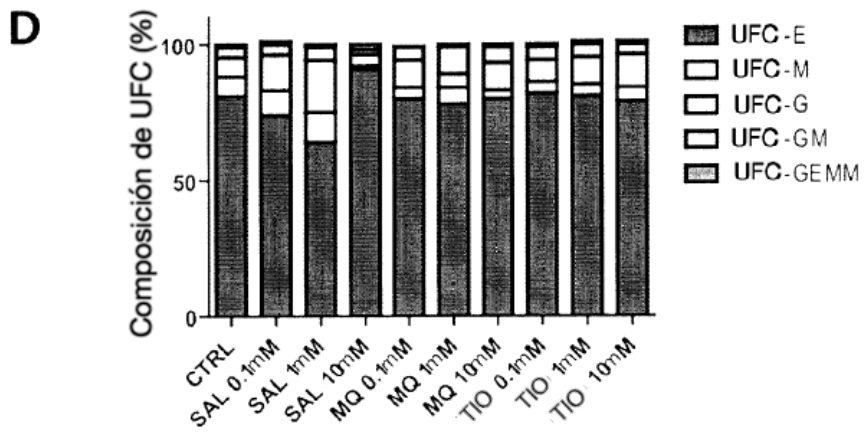
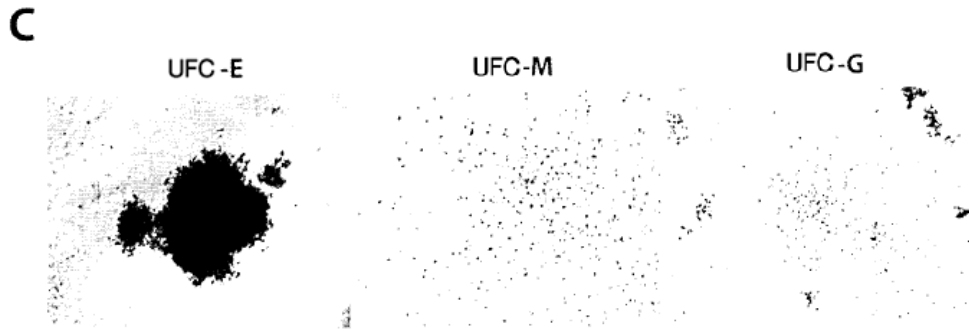


FIG. 11 (CONTINUACIÓN)

**A**

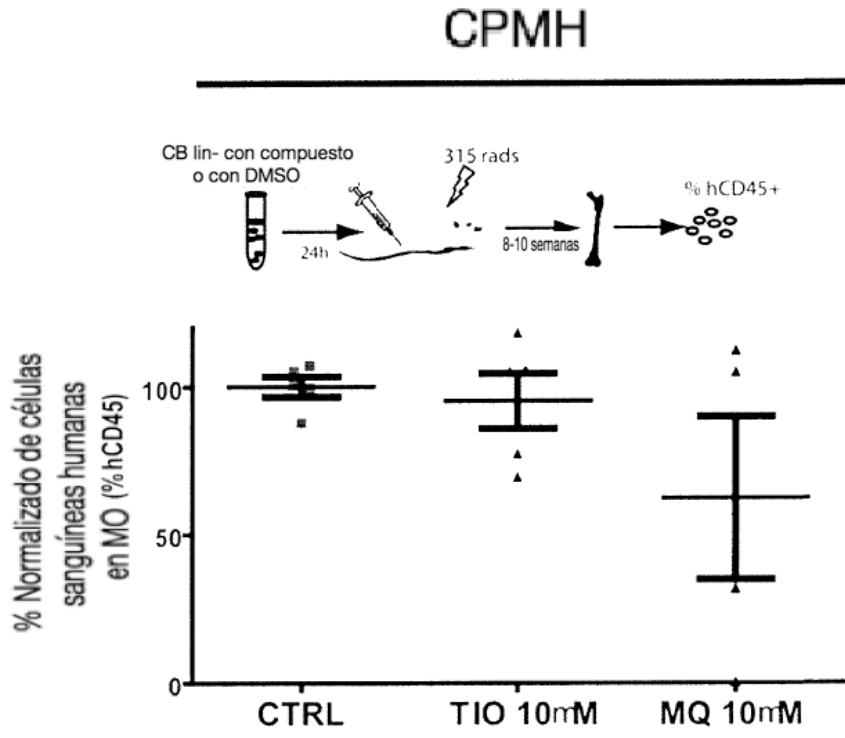


FIG. 12

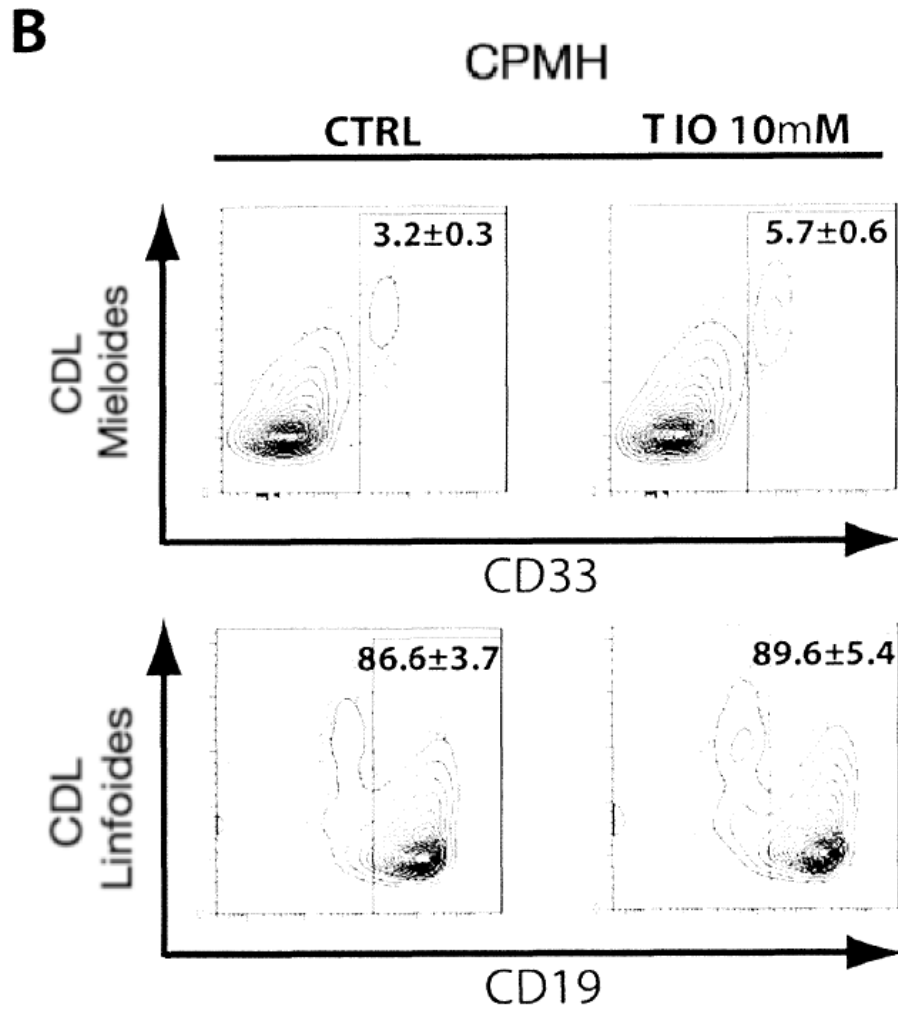


FIG. 12 (CONTINUACIÓN)

C

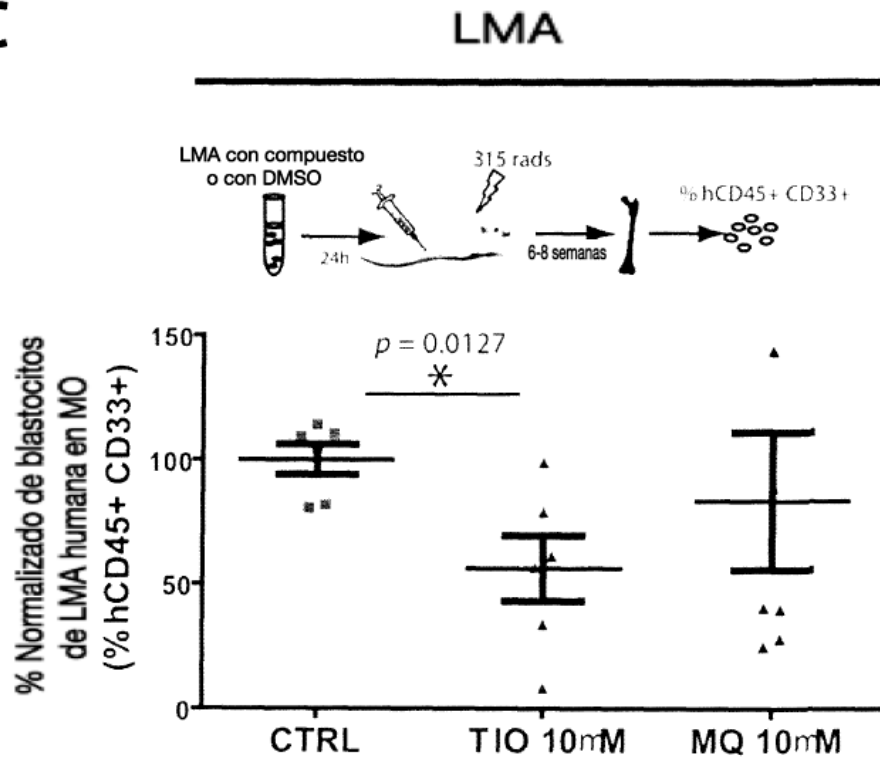
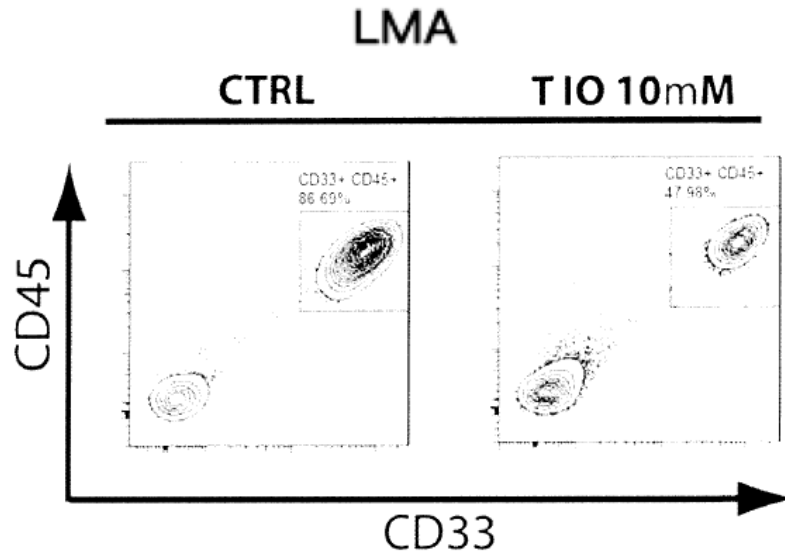


FIG. 12 (CONTINUACIÓN)

**D**



**E**

Relación CPMH hCD45: LMA CD33 hCD45	SAL	MQ	TIO *
	N/A	0.7	1.7

FIG. 12(CONTINUACIÓN)



**A**

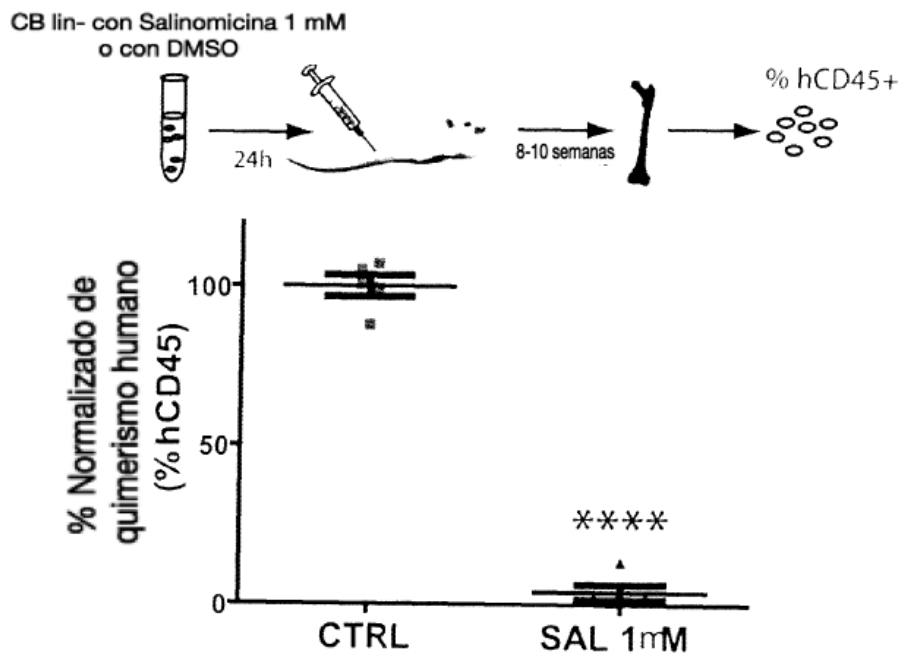


FIG. 13

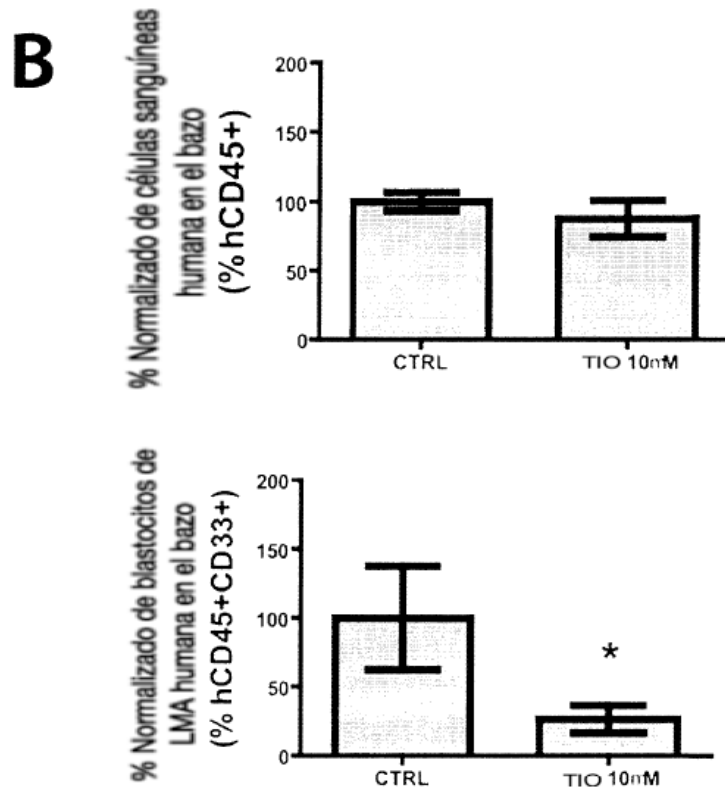
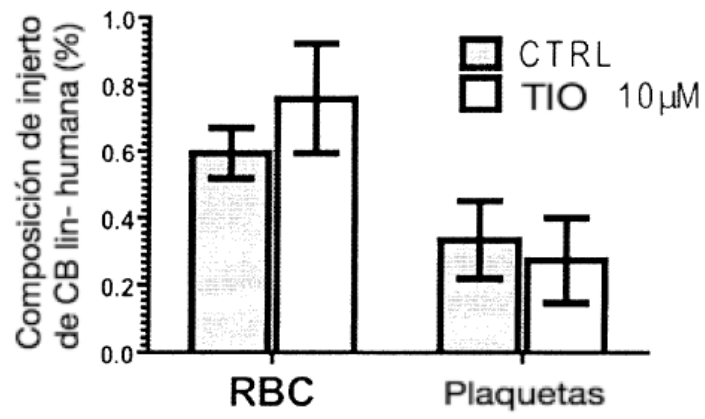


FIG. 13 (CONTINUACIÓN)

**C**



**D**

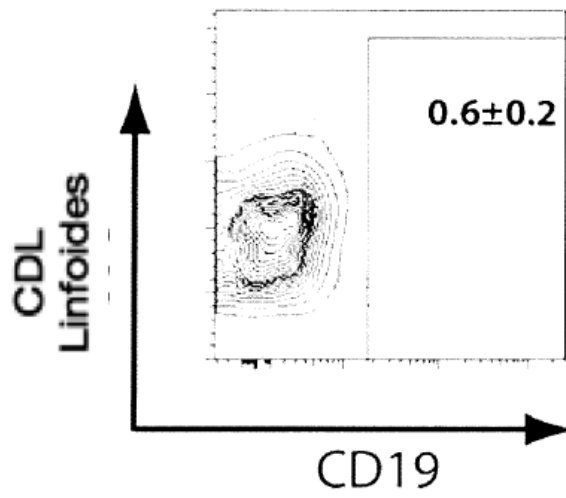


FIG. 13 (CONTINUACIÓN)

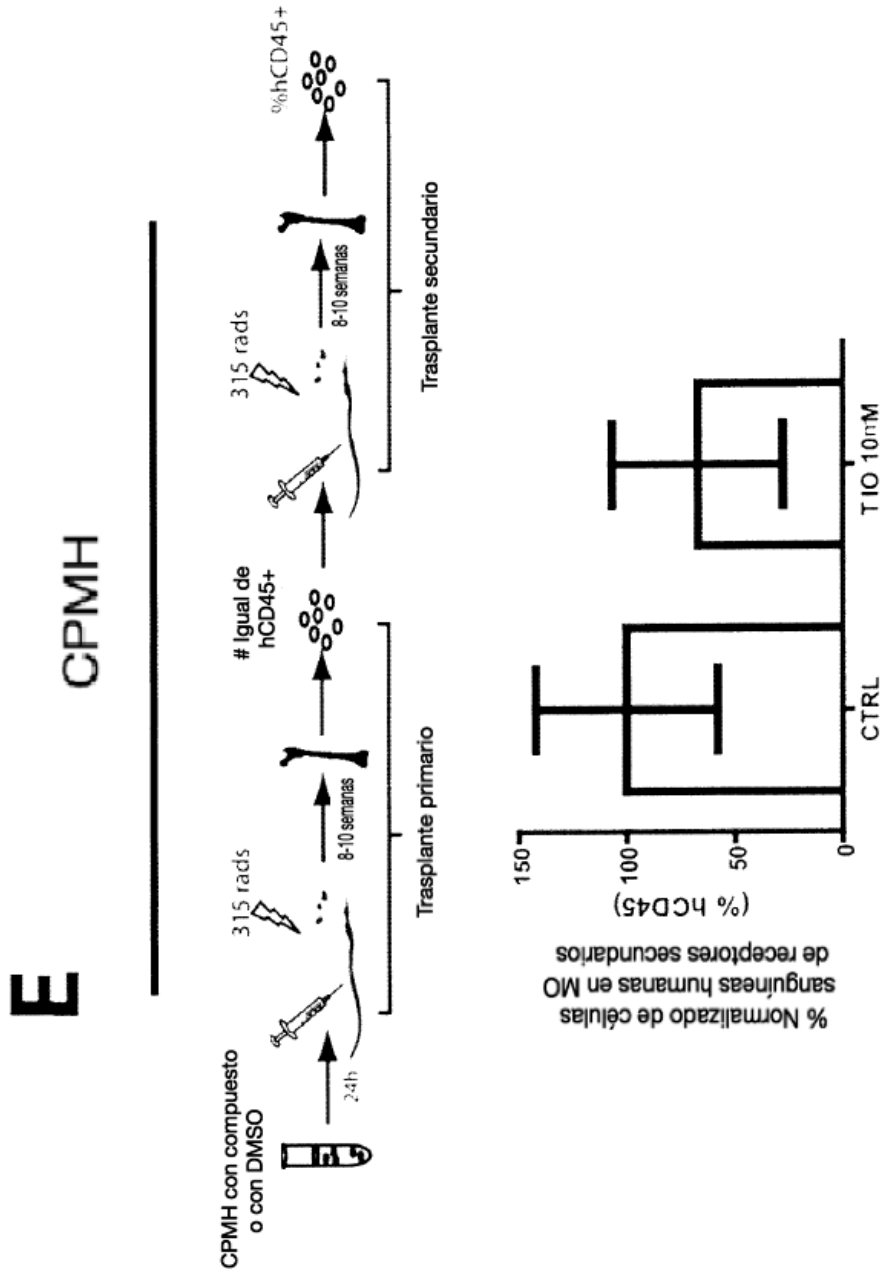
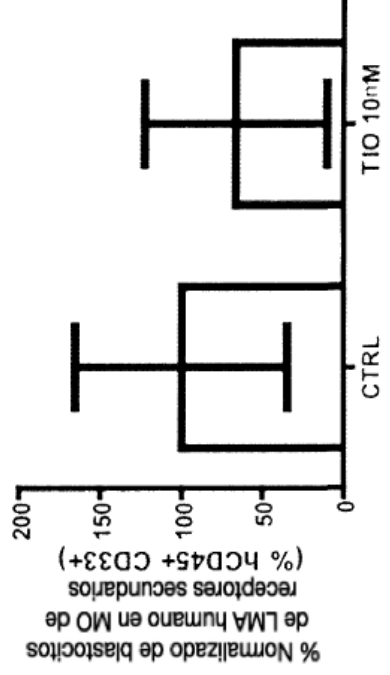
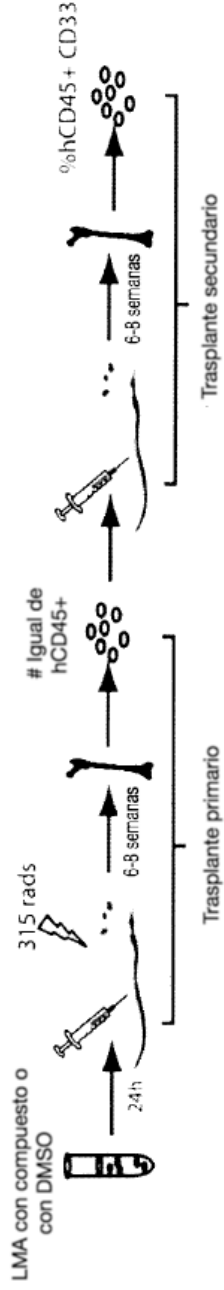


FIG. 13 (CONTINUACIÓN)

**F**

**LMA**



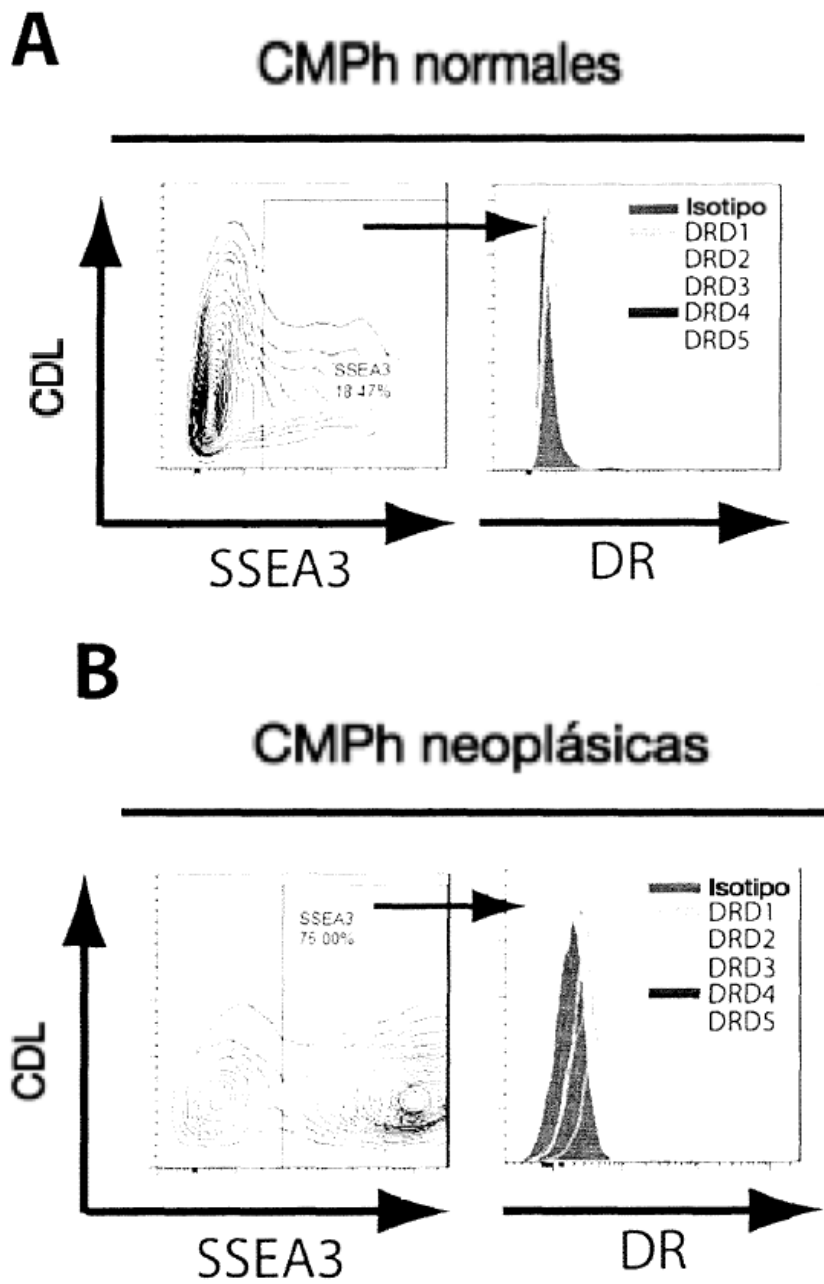
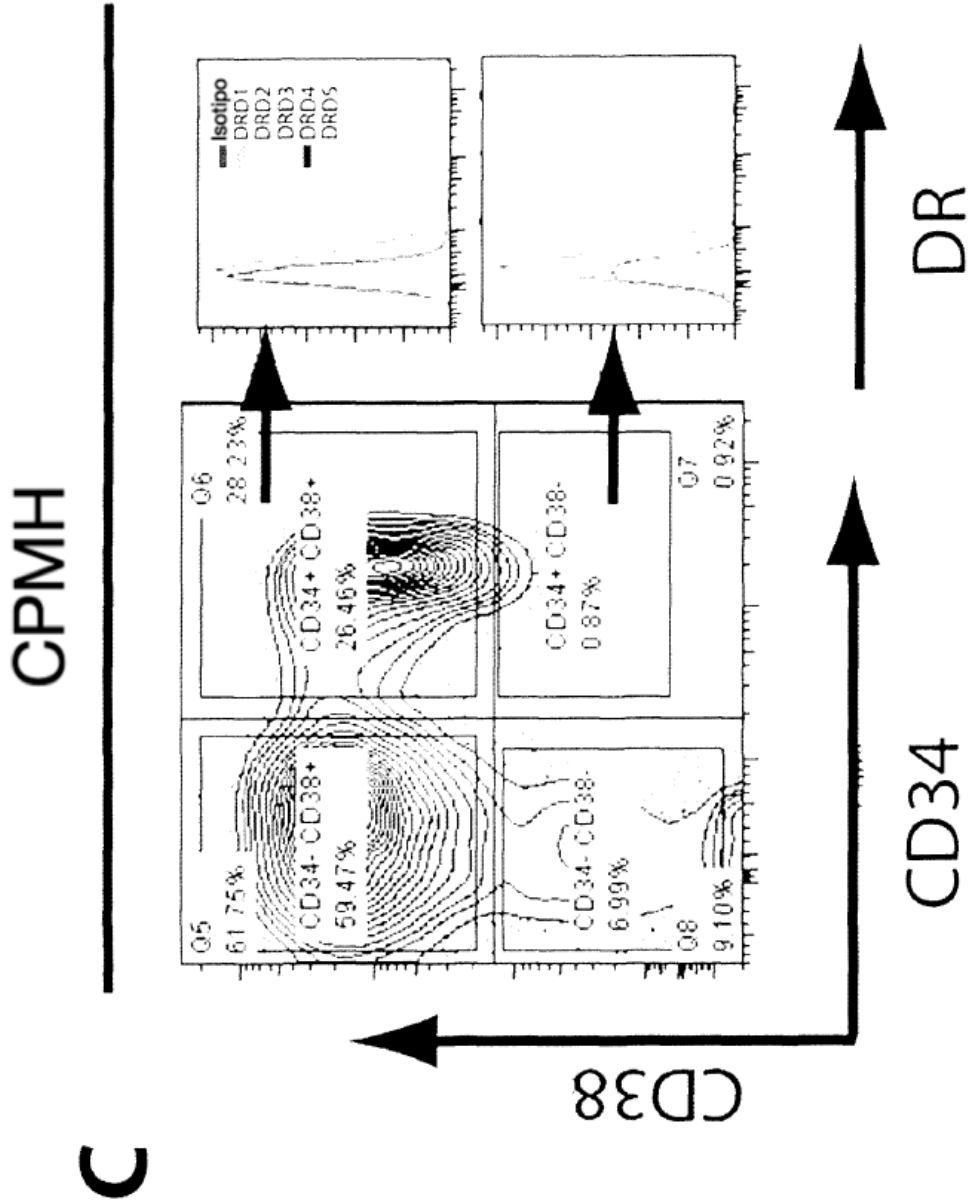


FIG. 14



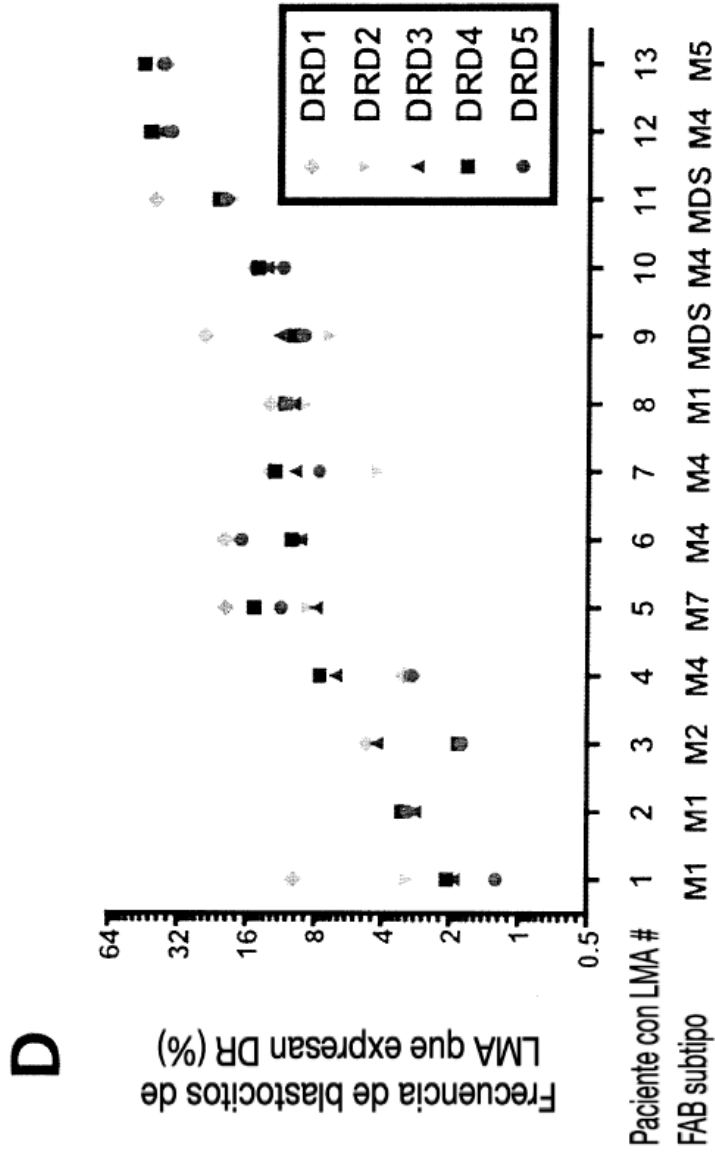


FIG. 14 (CONTINUACIÓN)



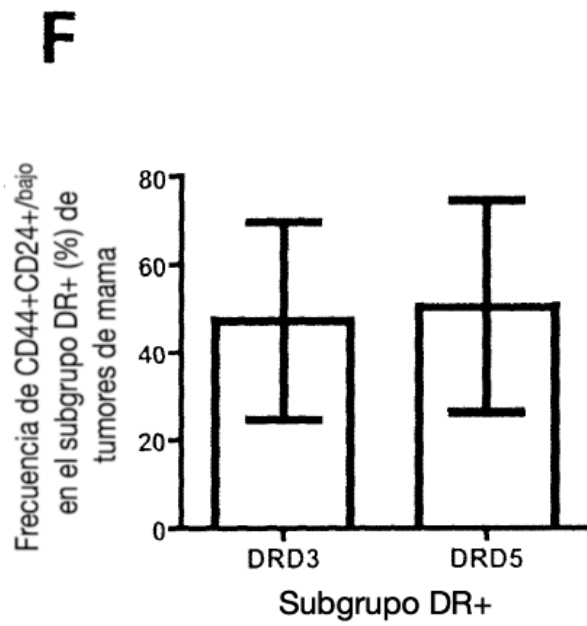
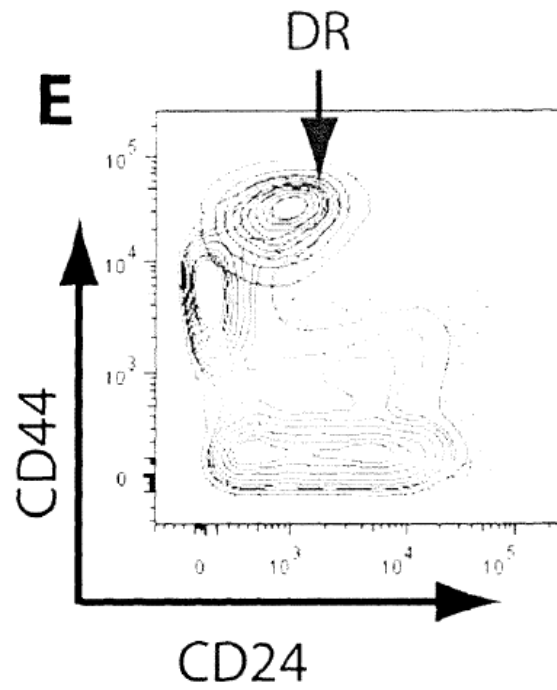


FIG. 14 (CONTINUACIÓN)

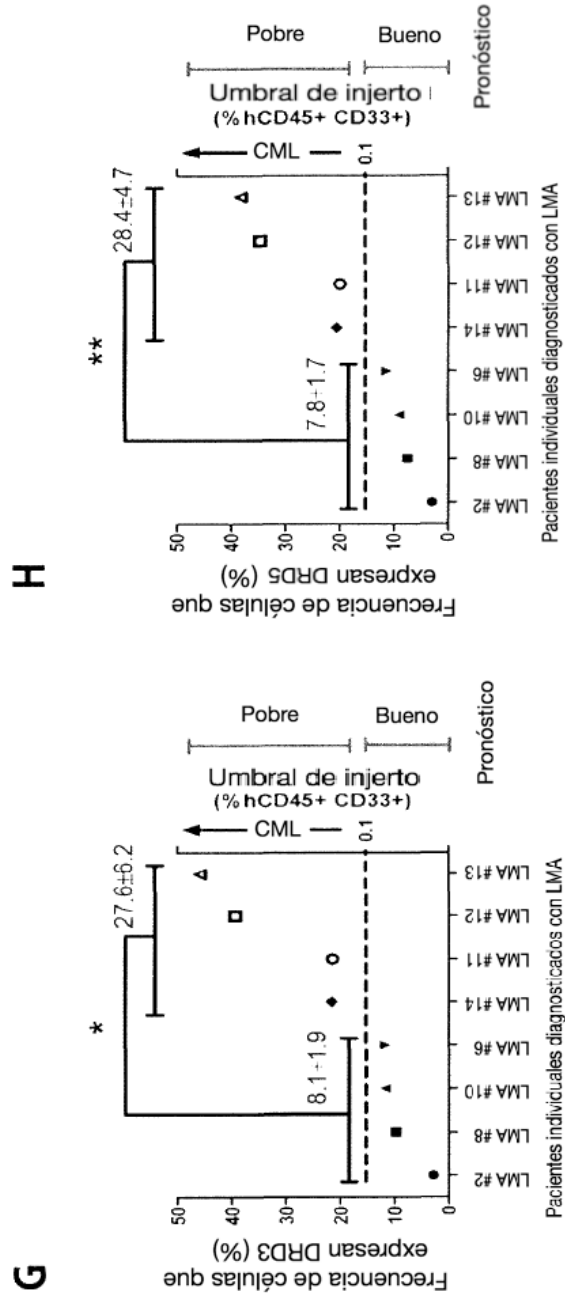
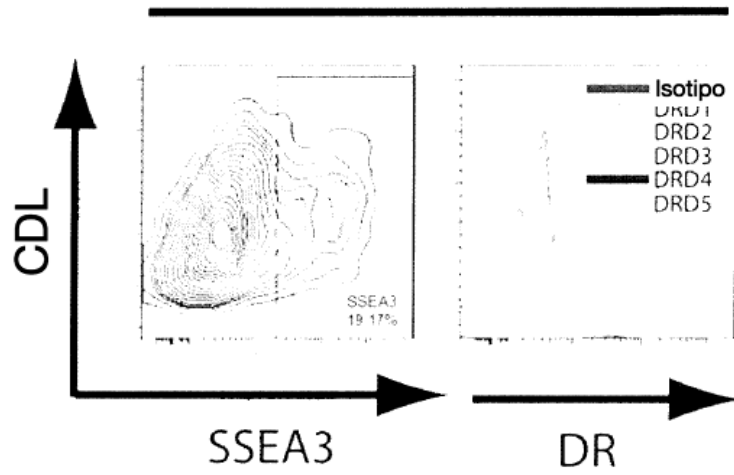


FIG. 14 (CONTINUACIÓN)

**A**

**CMPi derivadas de fibroblastos**



**B**

**CMPi derivadas de sangre de cordón umbilical**

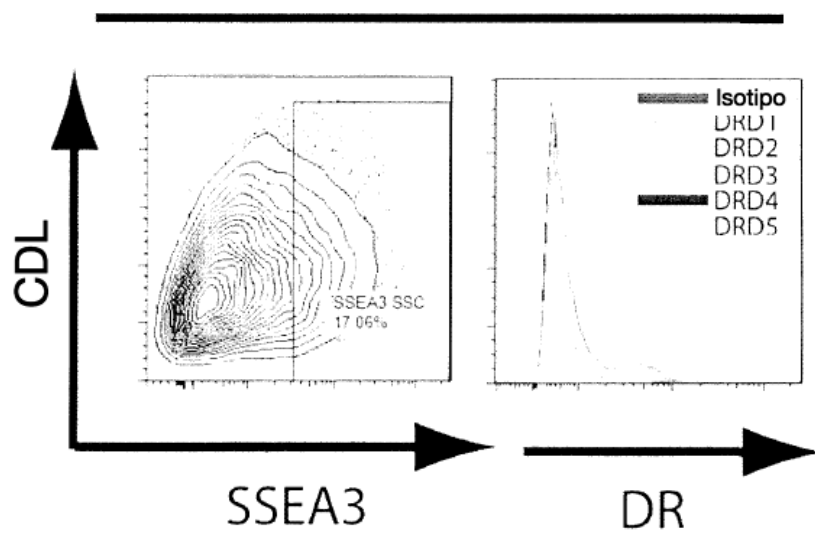


FIG. 15

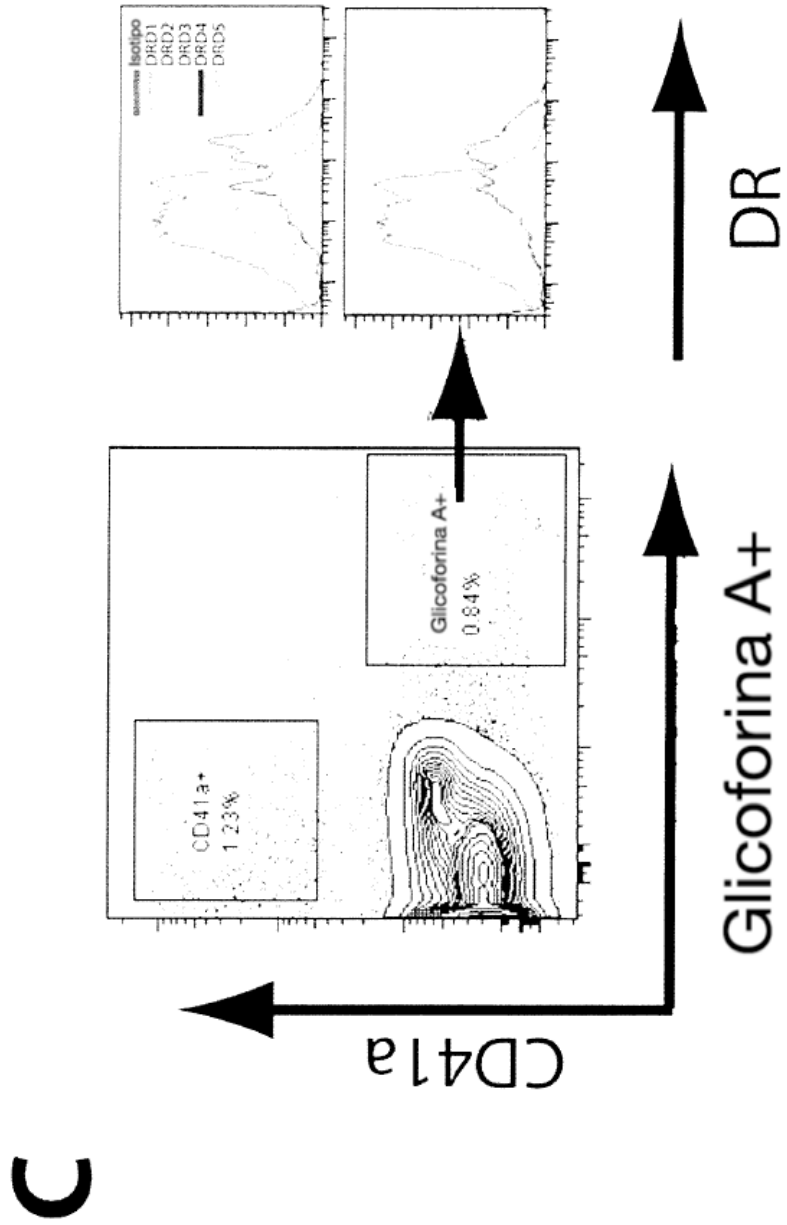


FIG. 15 (CONTINUACIÓN)

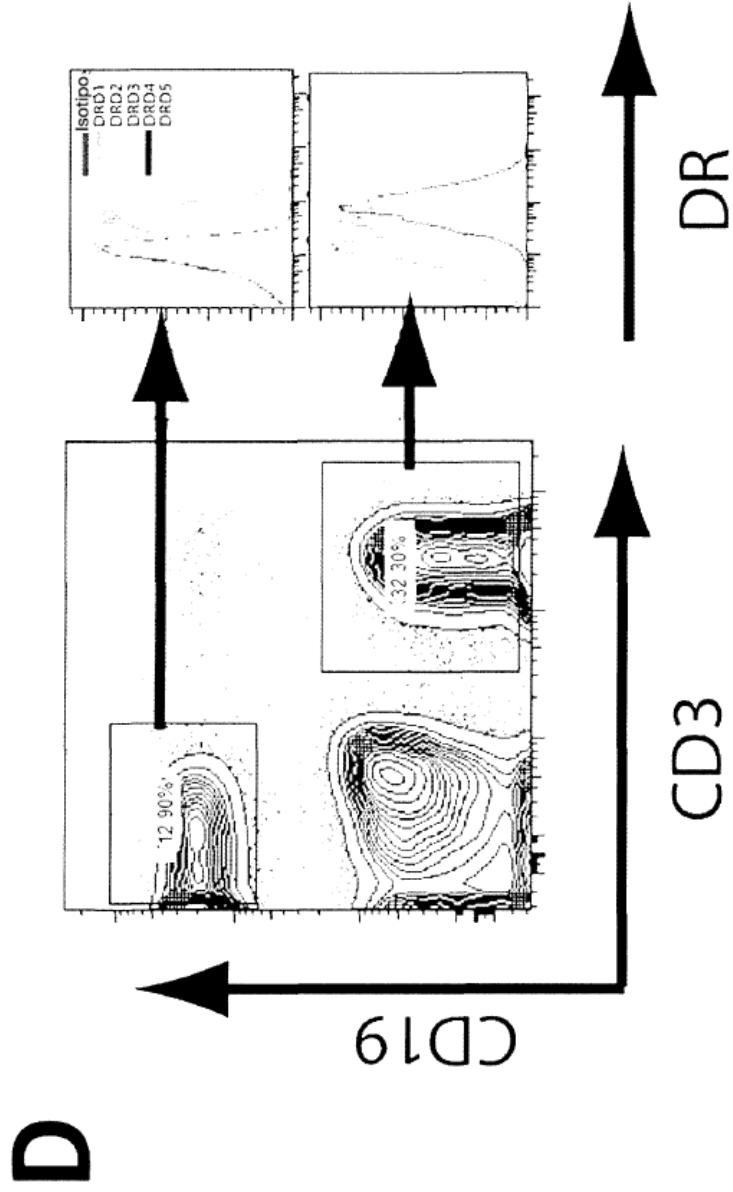


FIG. 15 (CONTINUACIÓN)

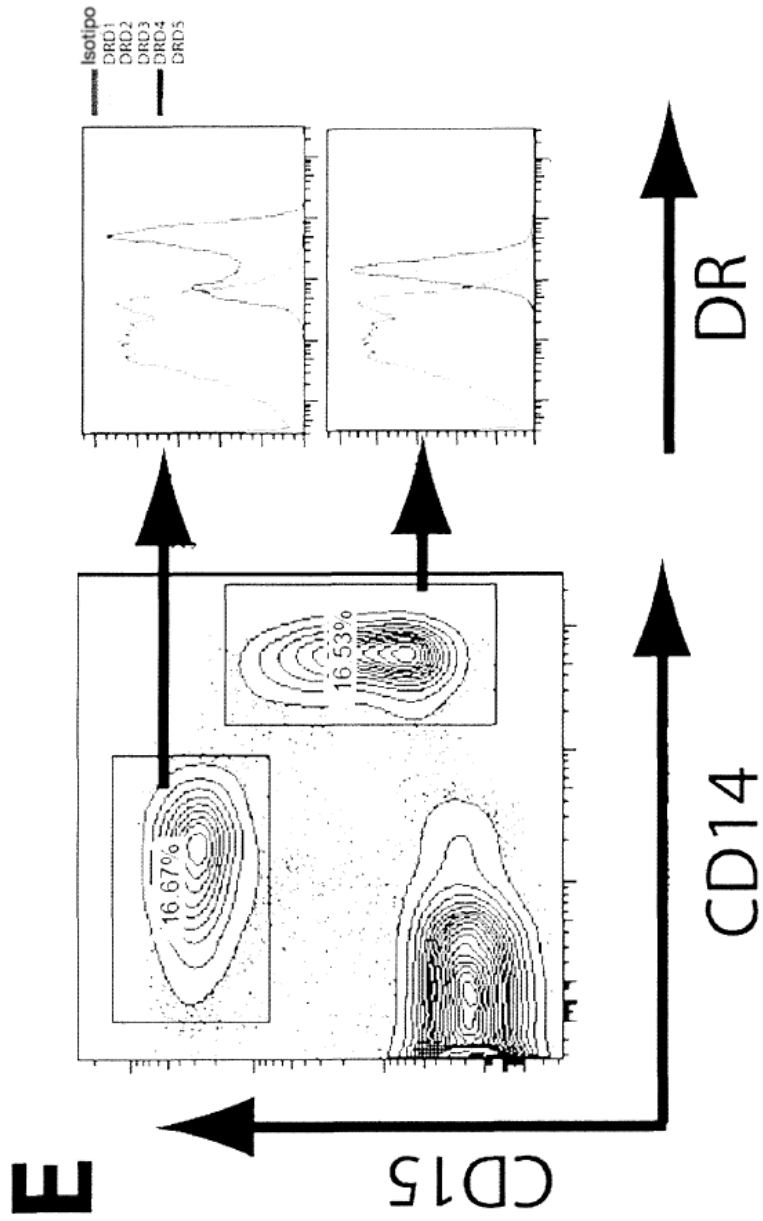


FIG. 15 (CONTINUACIÓN)

**F**

Tipo de célula	DR
Megacariocito	-
Eritrocito	-
Granulocito	+
Monocito	++
Célula B	-
Célula T	-

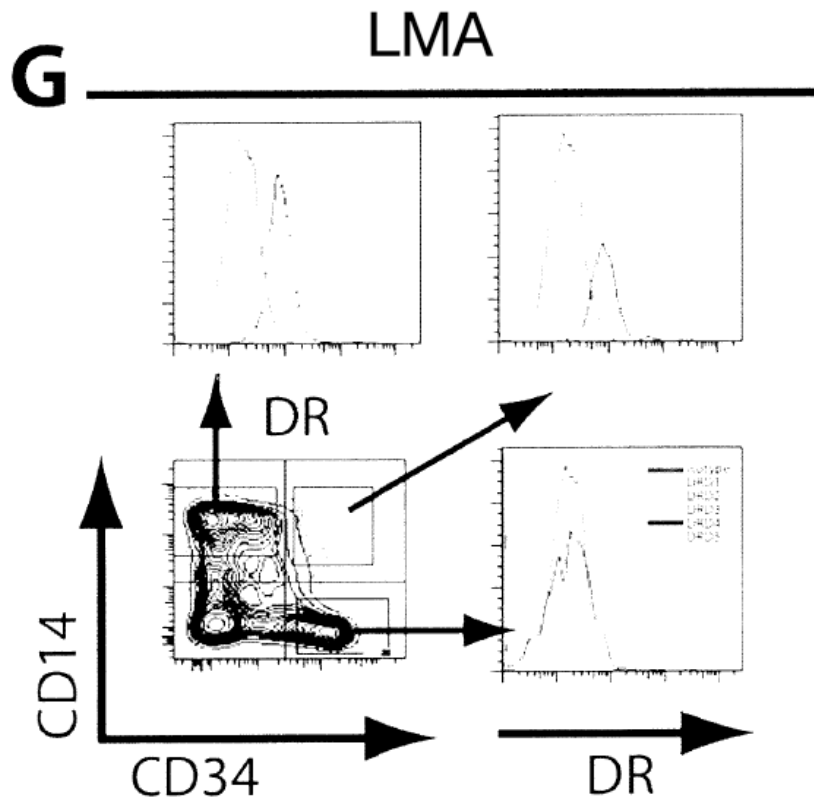


FIG. 15 (CONTINUACIÓN)

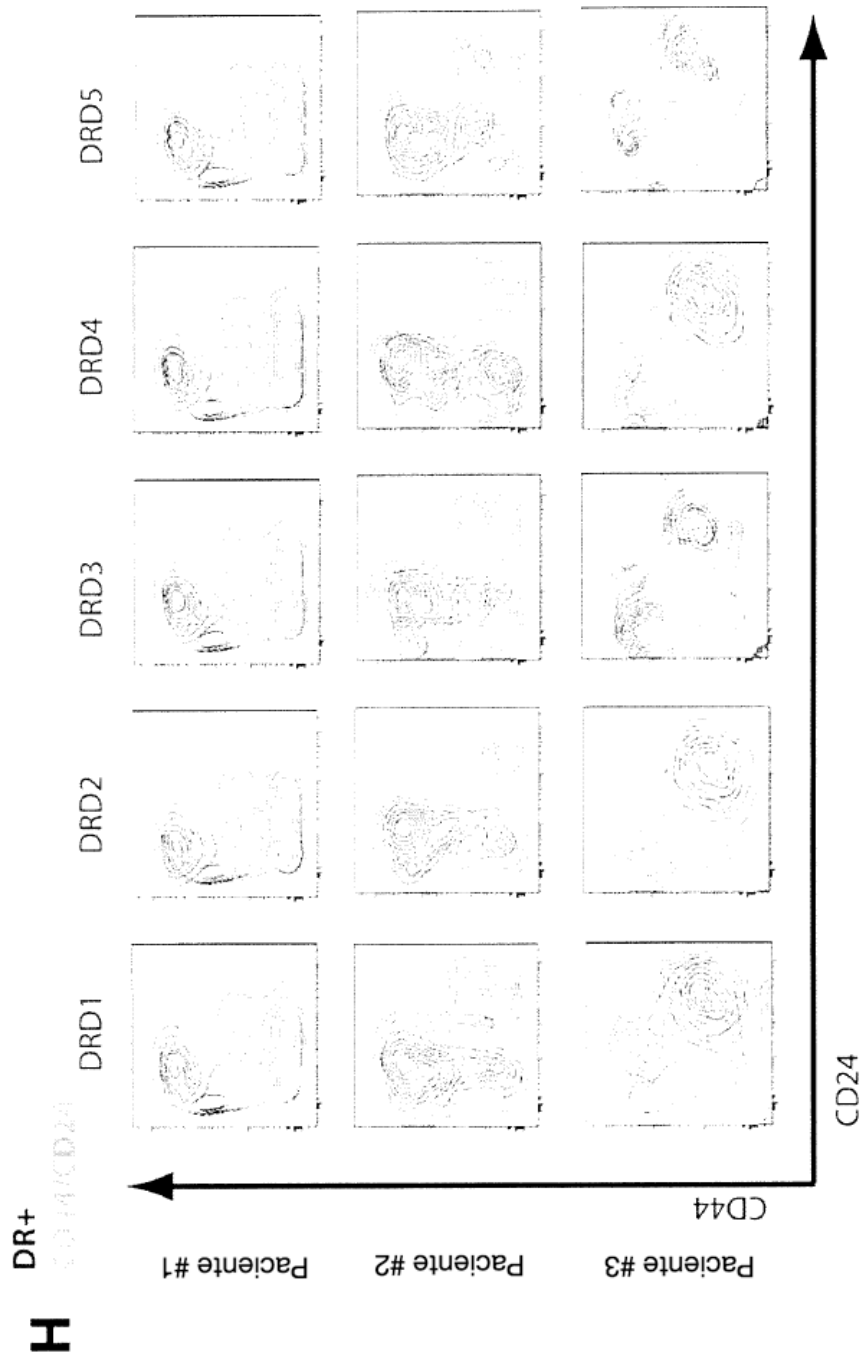


FIG. 15 (CONTINUACIÓN)



**A**

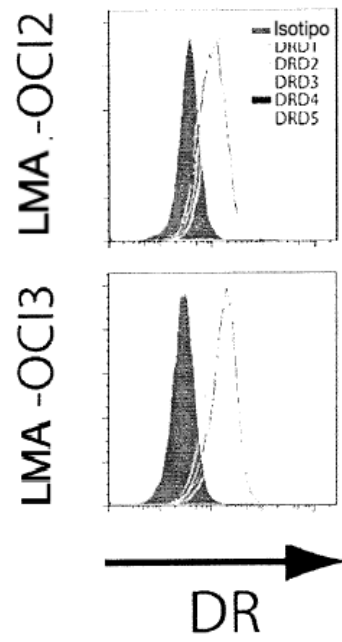
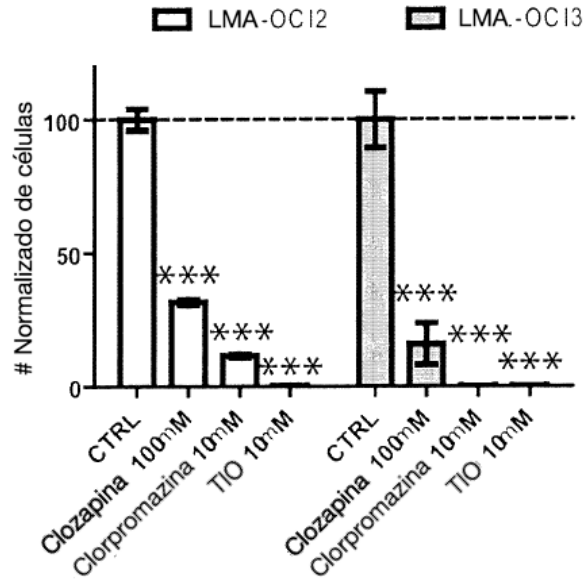


FIG. 16

**B**



**C**

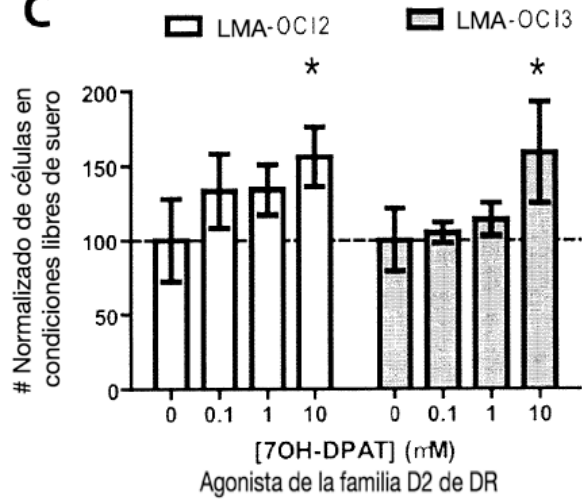


FIG. 16 (CONTINUACIÓN)

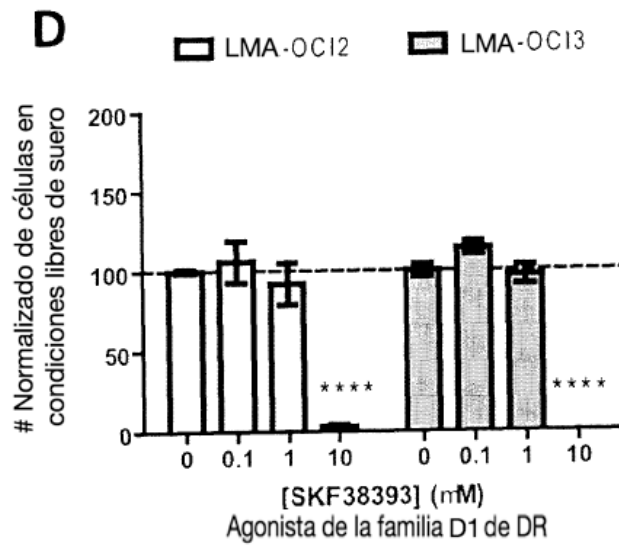


FIG. 16 (CONTINUACIÓN)

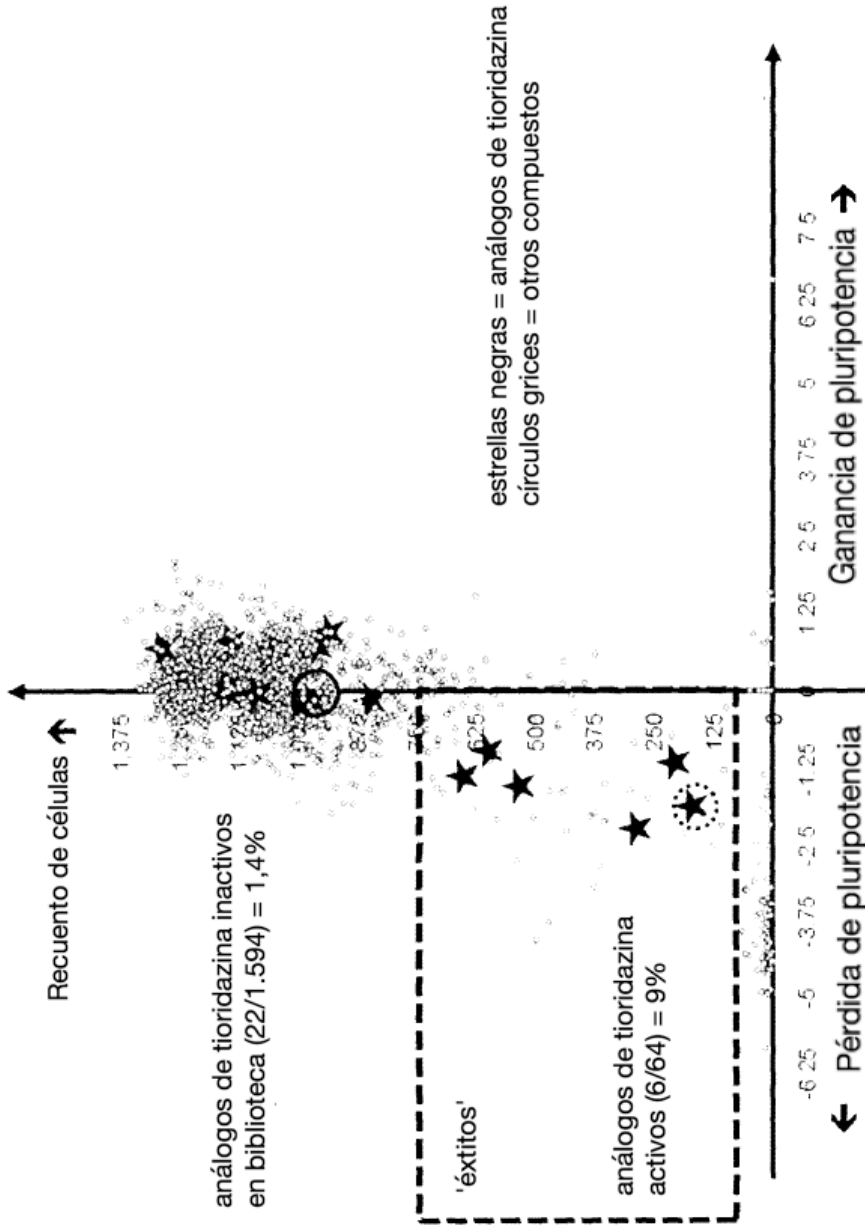


FIG. 17

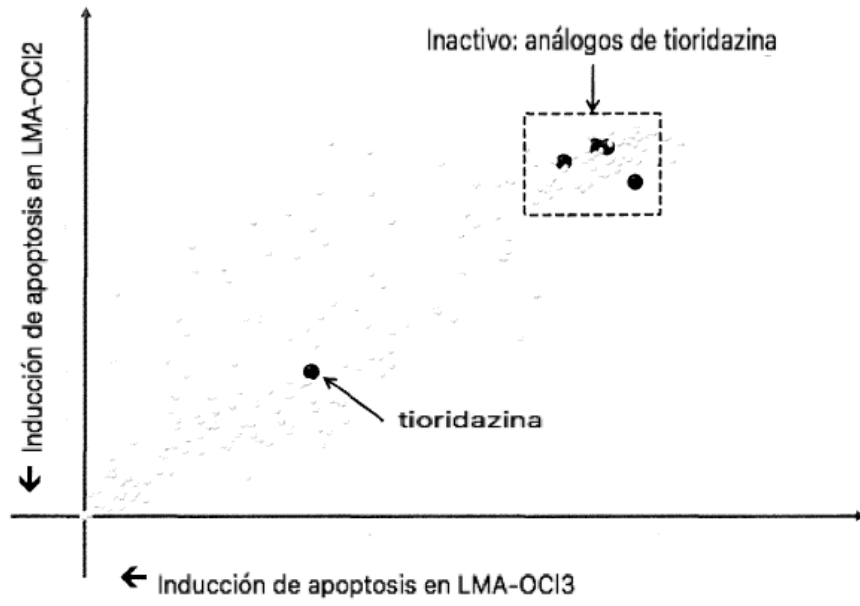


FIG. 18

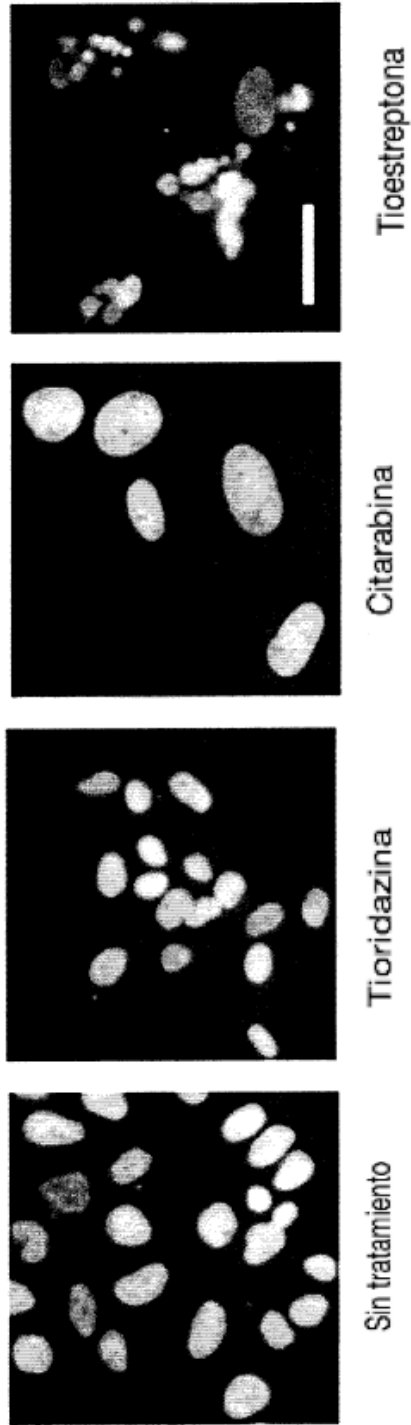


FIG. 19

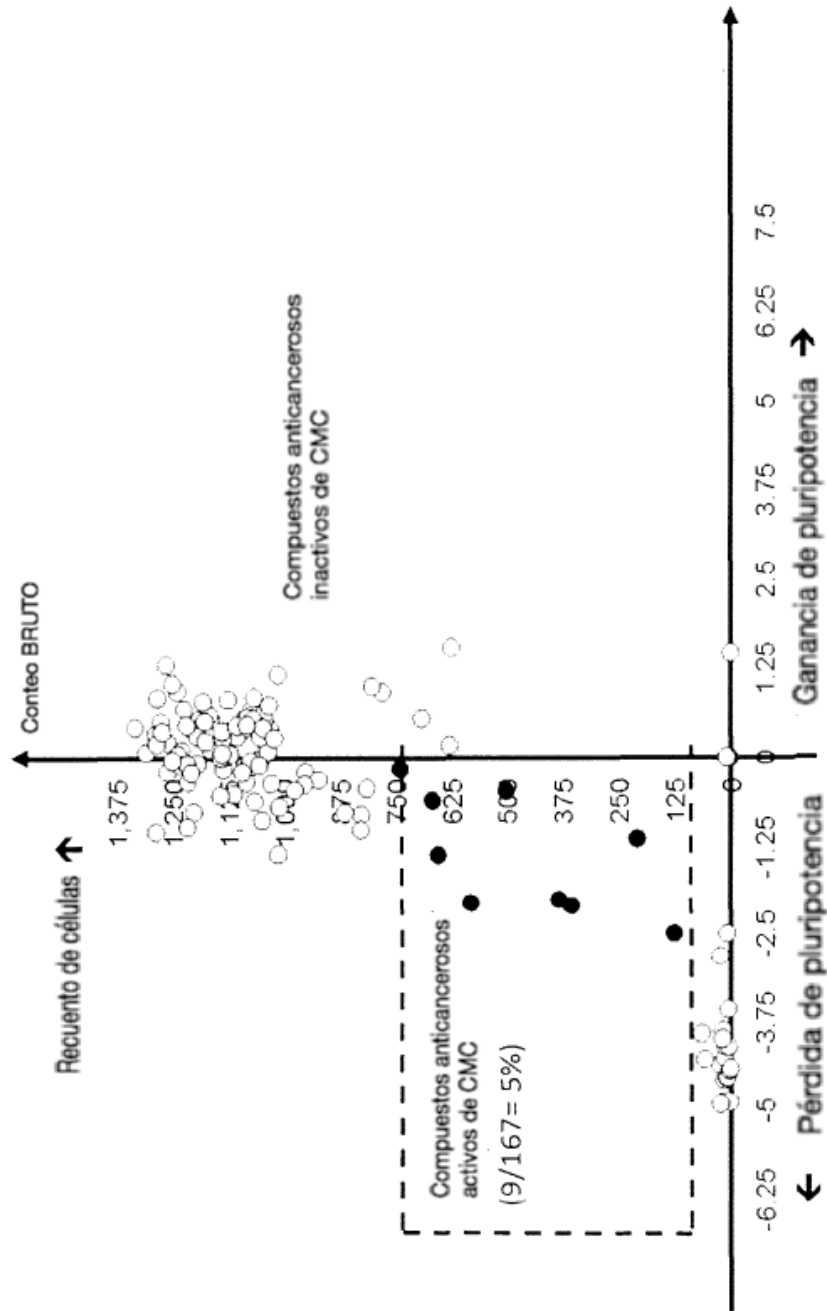


FIG. 20

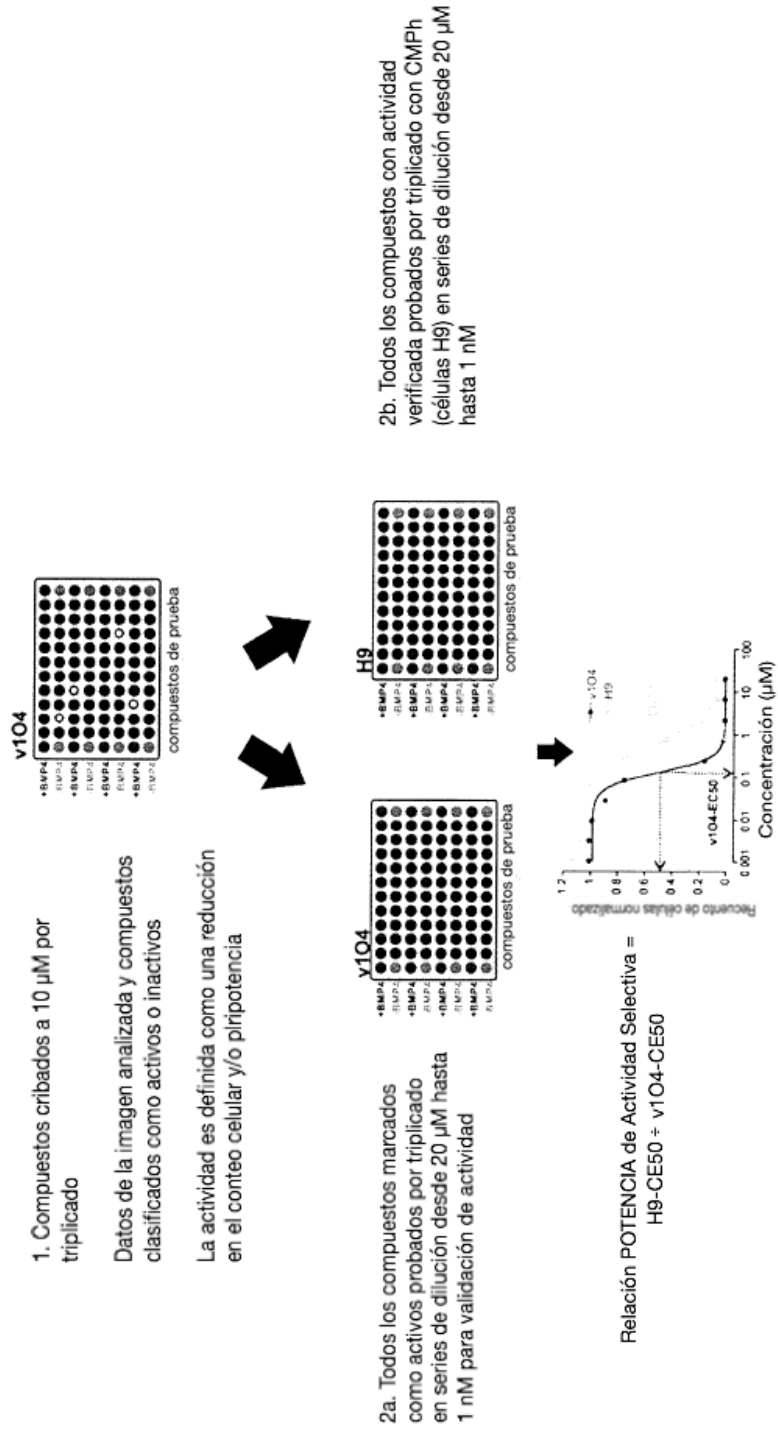
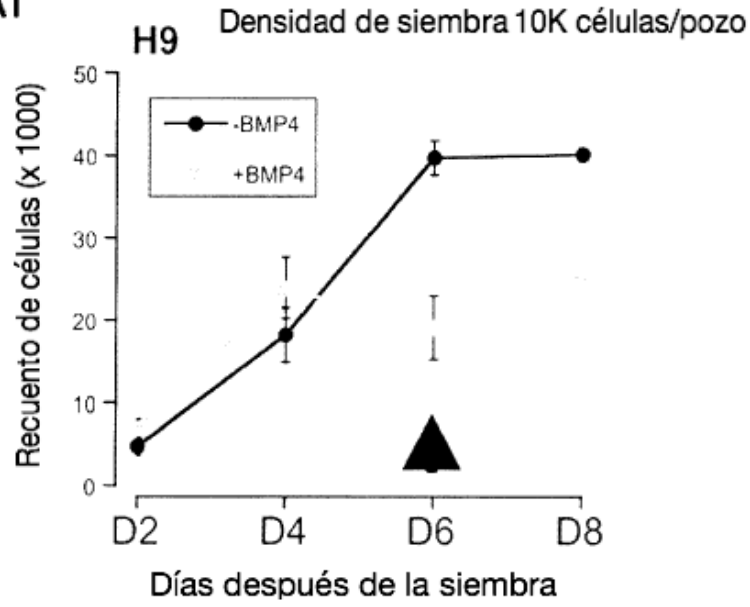


FIG. 21



Ai



Aii

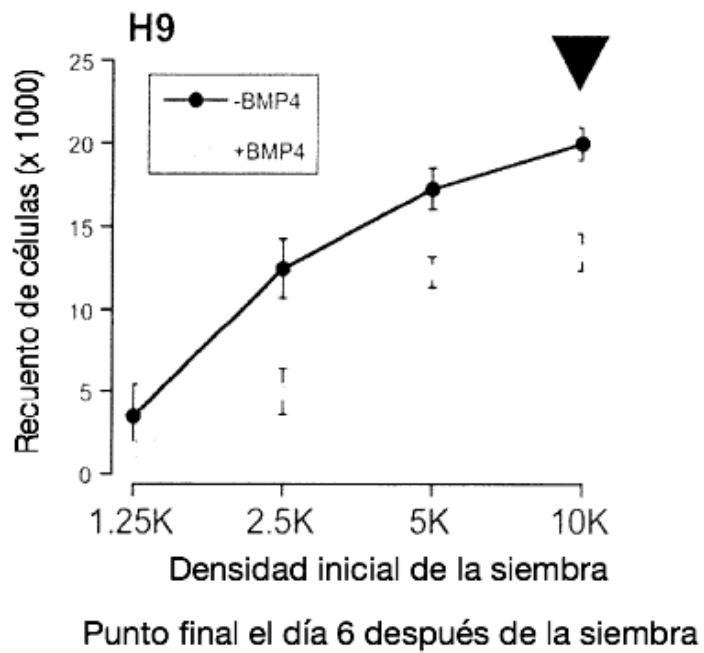


FIG. 22

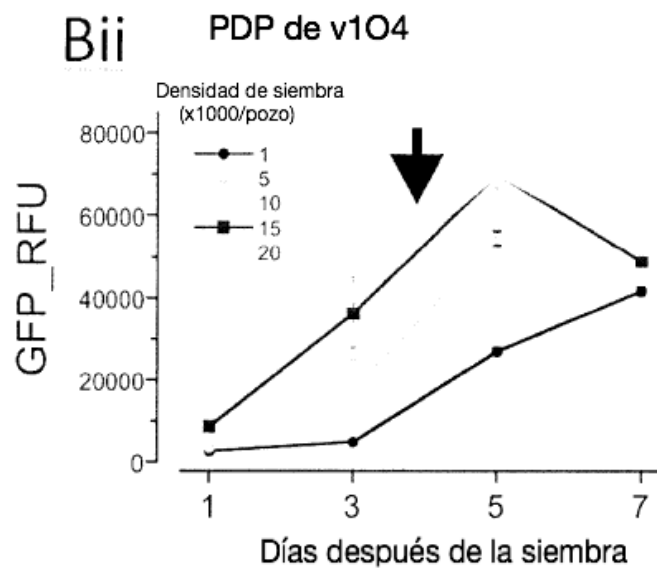
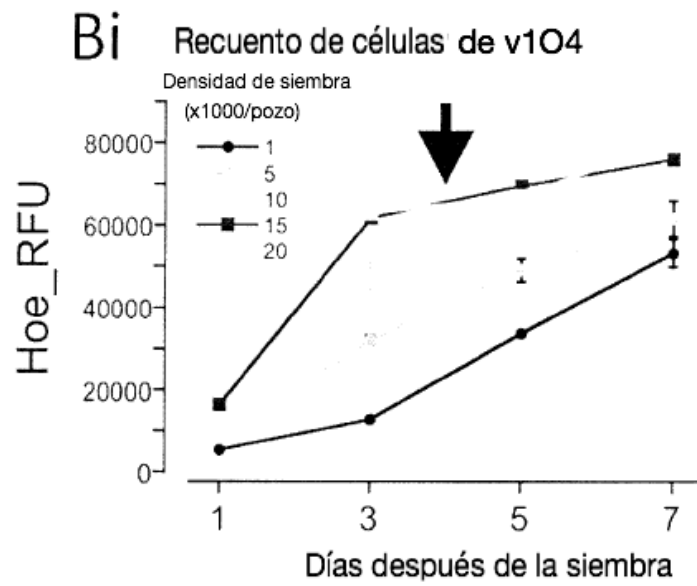
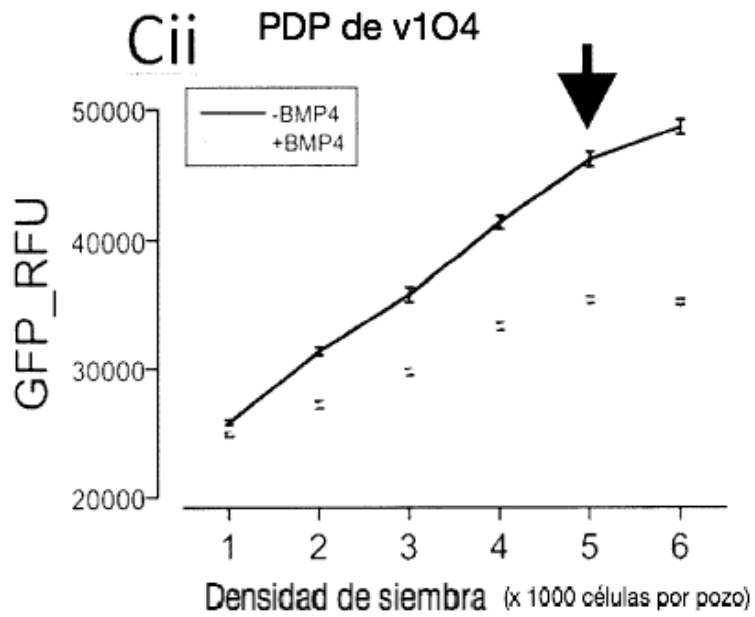
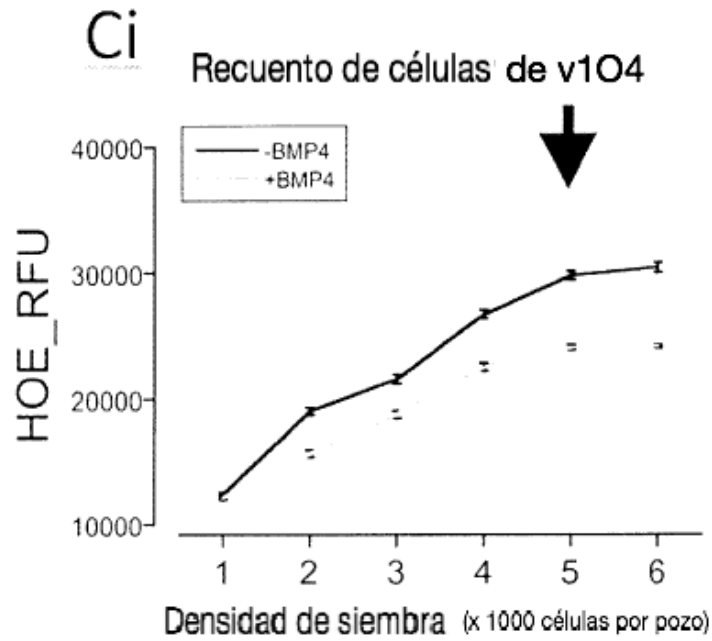


FIG. 22 (CONTINUACIÓN)



Punto final el día 4 después de la siembra

**FIG. 22 (CONTINUACIÓN)**

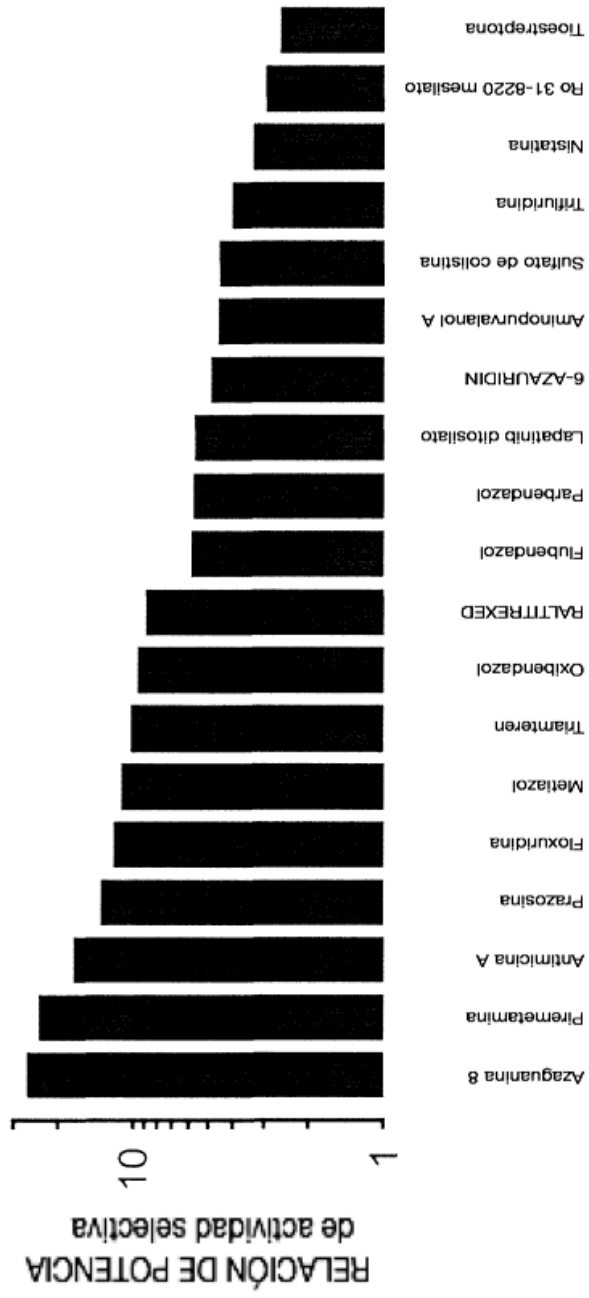


FIG. 23

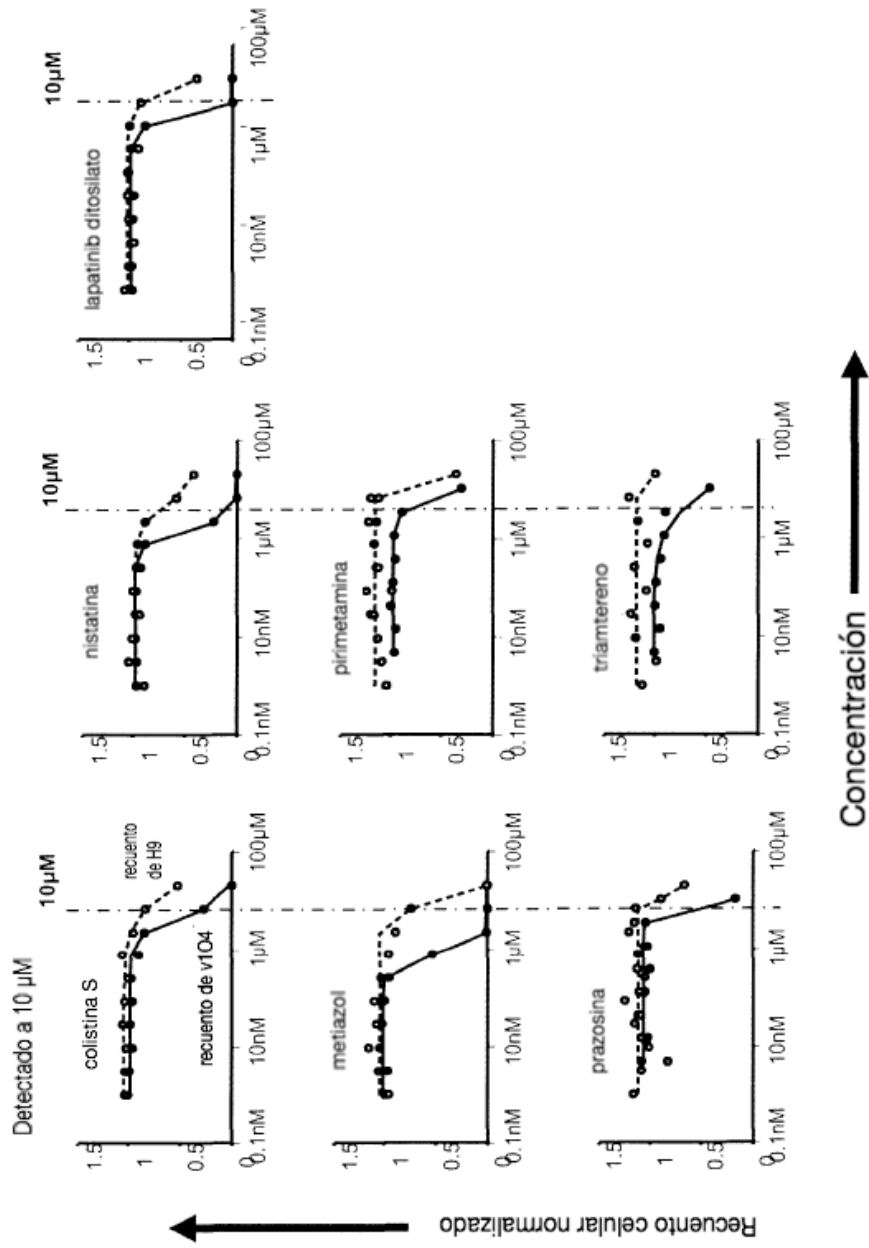


FIG. 24A

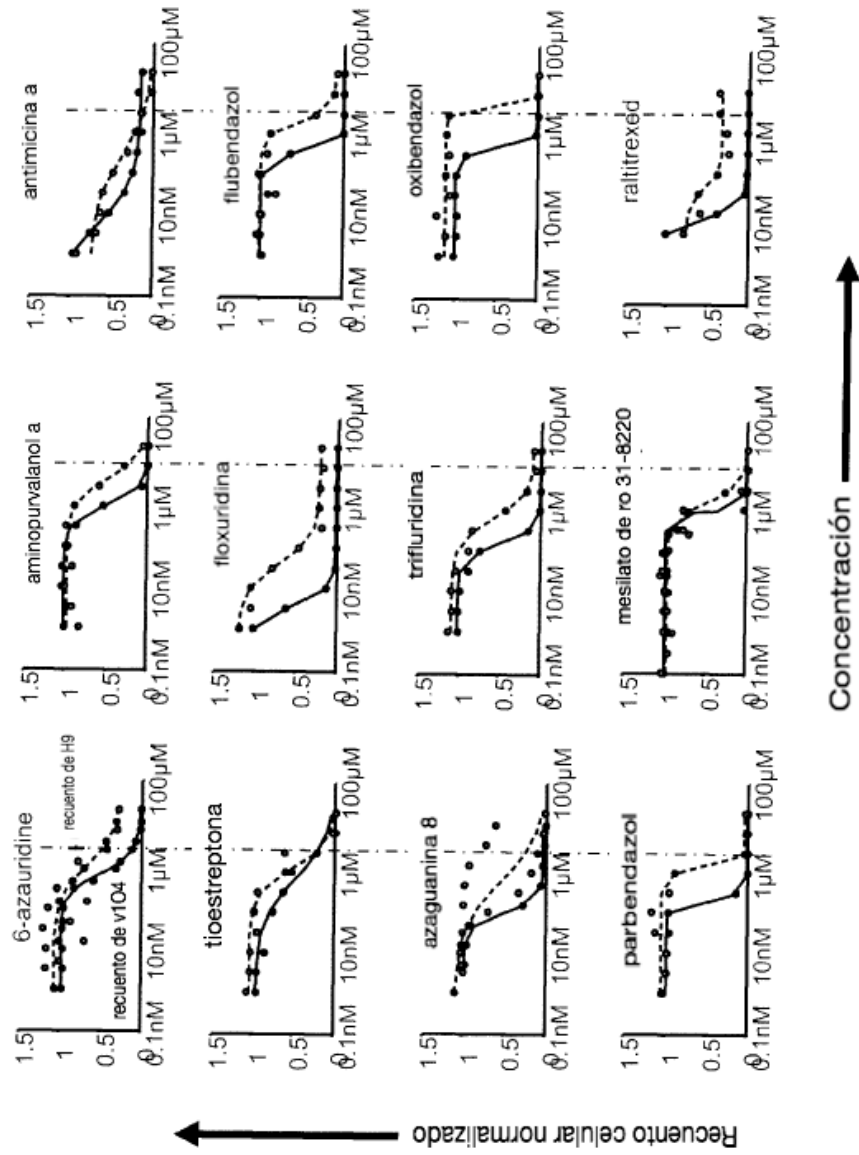


FIG. 24B

Punto de datos #	Nombre
1	proclorperazina
2	6-azauridina
3	aminopurvatanol a
4	antimicina a
5	azaguanina 8
6	sulfato de colistina
7	floxuridina
8	flubendazol
9	flufenazina
10	ditosilato de lapatinib
11	metiazol
12	nistatina
13	oxibendazol
14	parbendazol
15	perfenazina
16	prozosina
17	pirimetamina
18	raltitrexed
19	mesilato de ro 31-8220
20	tioestreptona
21	trifluoperazina
22	trifluridina
23	tioridazina
24	trifluopromazina
25	triamtereno

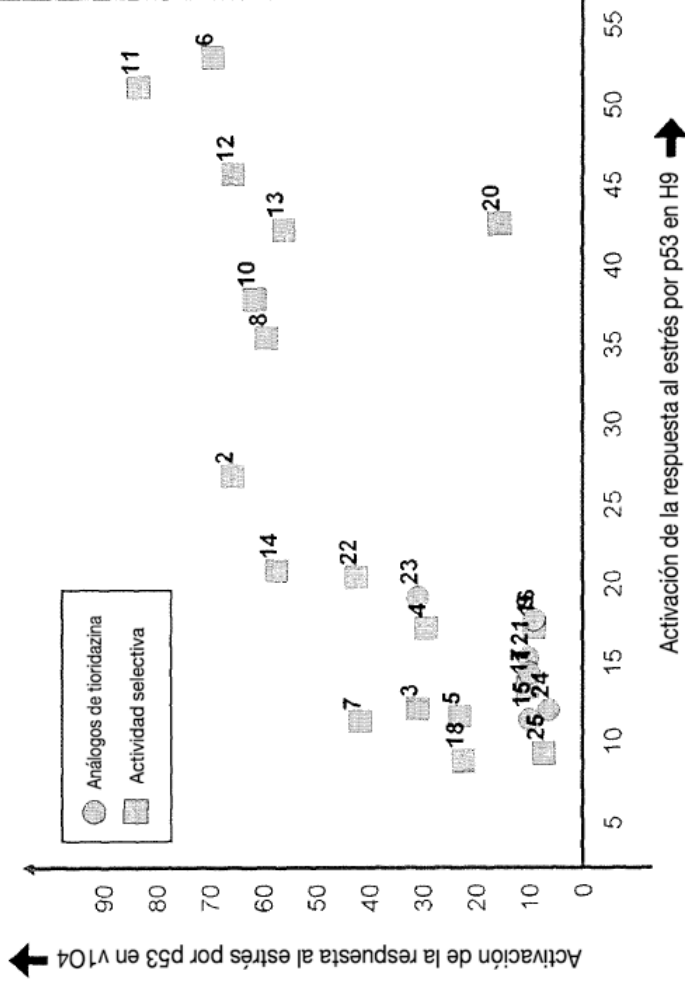


FIG. 25

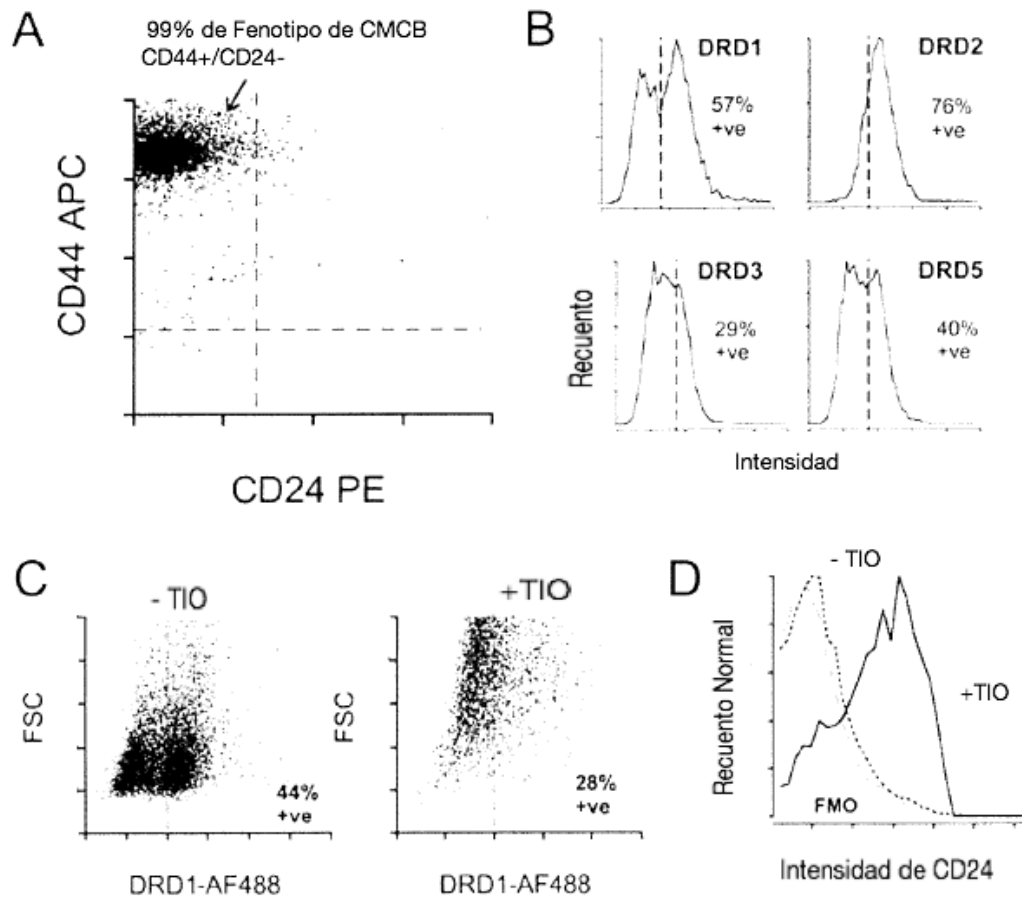


FIG. 26



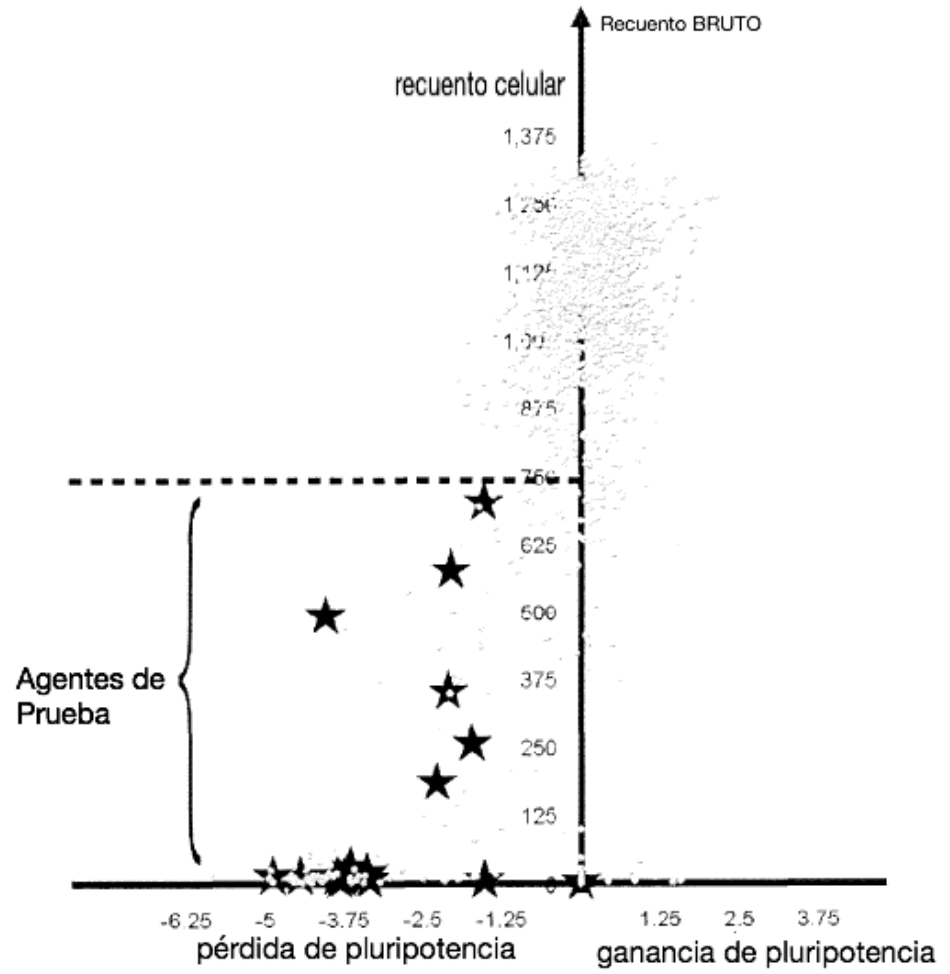


FIG. 27