

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 601**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2006 E 16171392 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3117833**

54 Título: **Inhibición del potencial tumorigénico de células madre tumorales por LIF**

30 Prioridad:

19.07.2005 US 700859 P

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

26.04.2019

73 Titular/es:

**STEMGEN S.P.A. (100.0%)
Viale Bianca Maria 25
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**VESCOVI, ANGELO LUIGI y
REYNOLDS, BRENT ALLAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 710 601 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

Inhibición del potencial tumorigénico de células madre tumorales por LIF

Antecedentes de la invención**Células madre neurales**

5 Tradicionalmente se pensaba que las células madre estaban situadas solamente en aquellos tejidos en los que las células diferenciadas estaban más expuestas a pérdida y a una gran necesidad de reemplazo, tales como la piel (Huelsken et al, Cell 105: 533-45, 2001), epitelios intestinales (Potten et al., Development 110: 1001-20, 1990) y la sangre (Morrison et al., Annu Rev Cell Dev Biol 11: 35-71, 1995). De hecho, el ejemplo más conocido de una célula madre adulta es la célula madre hematopoyética (HSC hematopoietic stem cell) que se encuentra en la médula ósea y que en última instancia es responsable de la generación de todos los tipos de células de la sangre a lo largo de la vida del animal (Morrison et al., supra.; Weissman, Cell 100: 157-68, 2000; Weissman, Science 287: 1442-6, 2000). Ya que se pensaba que el sistema nervioso central (SNC) adulto no presentaba una cantidad significativa de muerte neuronal, y no tiene capacidad de regeneración, la existencia de células madre neurales parecía tanto improbable como innecesaria. Sin embargo, en 1992, dos grupos independientes demostraron con éxito la existencia de células precursoras dentro del SNC de los mamíferos adultos con la capacidad de dar origen a nuevas neuronas (Reynolds and Weiss, Science 255: 1707-10, 1992; Richards et al., Proc Natl Acad Sci U S A 89: 8591-5, 1992).

La fuente de las nuevas neuronas fue identificada como células madre que revisten interiormente la totalidad del neuroeje ventricular del sistema nervioso de los mamíferos adultos (Reynolds and Weiss, 1992). Lo mismo que las células madre encontradas en otros tejidos, se ha comprobado que las células madre del SNC (o células madre neurales (CMN)) demuestran la definición *in vitro* de las características de las células madre (Hall et al., Development 106: 619-33, 1989; Potten et al, supra) en cuanto a proliferación, amplia capacidad de autorrenovación, generación de una numerosa progenie, potencial de diferenciación entre múltiples cepas y la característica *in vivo* de regenerar los tejidos después de una lesión.

Uno de los papeles de una célula madre es el de dividir y dar origen a más células precursoras dedicadas provistas de la capacidad de proliferar y de generar un gran número de células no diferenciadas. En última instancia es la progenie de estos tipos de células precursoras dedicadas la que da origen a una progenie diferenciada. Por lo tanto, puede considerarse que las células madre son un reservorio relativamente quiescente de células no dedicadas con la capacidad de dividirse a lo largo de la vida del animal y, por lo tanto, con un amplio potencial de proliferación, mientras que las células progenitoras son más dedicadas y se dividen más frecuentemente pero tienen un potencial de proliferación más limitado a lo largo del tiempo. Tanto durante su desarrollo como en su etapa adulta, la proliferación de las células madre y de las células progenitoras apuntala la génesis celular.

Debido a la ausencia de cualquier firma morfológica, molecular o antigénica específica, las células madre se identifican en base a un criterio funcional. Por lo tanto, para estudiar la regulación de las células madre *in vitro*, es necesario desarrollar una metodología para el cultivo de tejidos que induzca la división de las células madre. Existen pocos ensayos de este tipo; sin embargo, en el sistema nervioso, se utiliza comúnmente una metodología de cultivo denominada NA (Neurosphere Assay, Ensayo de Neuroesfera) (Reynolds and Weiss, supra.) para identificar, propagar y enumerar NSCs *in vitro*. En pocas palabras, el NA implica la microdissección de tejido de SNC embrionario a adulto seguido por la ruptura de los contactos de célula a célula y la generación de una suspensión celular individual. Las células se aplican (normalmente con una baja densidad) en material para cultivo de tejidos en un medio definido libre de suero en la presencia de por lo menos un factor de crecimiento en la presencia del por lo menos un factor de crecimiento promotor de la proliferación (es decir, EGF (Epidermal Growth Factor, Factor de Crecimiento Epidérmico), bFGF (basic Fibroblastic Growth Factor, factor de crecimiento fibroblástico básico), etc.). En estas condiciones, dentro de 2-5 empieza a dividirse un SNC multipotente que da origen a un clúster clonalmente derivado de células no diferenciadas que llevan la denominación de "neuroesfera". En la presencia continua del factor inductor de la proliferación, las células presentes en la neuroesfera continúan dividiéndose, dando como resultado un incremento en el número de células de comprender la neuroesfera y, por lo tanto, el tamaño de la neuroesfera. Las neuroesferas pueden recolectarse, disgregarse en forma de una suspensión celular individual, y las células pueden ser aplicadas como recubrimiento en un cultivo para generar nuevas neuroesferas. El pasaje por el SNC de esta manera da como resultado un incremento aritmético en células precursoras viables del SNC. El ensayo de NA permite aislar los NCSs y expandirlas en condiciones definidas de manera tal que es posible estudiar el comportamiento de las células madre putativas en diferentes condiciones experimentales. El NA ha llegado a ser el ensayo estándar para el aislamiento de SNC de mamíferos y forma el núcleo de muchos ensayos utilizados para entender la biología celular y molecular de las células madre en el sistema nervioso.

El concepto de tumores que surgen de una pequeña población celular con características de células madre que contribuyen al crecimiento y propagación del tumor no es nuevo en el campo de la biología del cáncer. La idea fue propuesta a principios de los años 70 y ha sido confirmada experimentalmente en estudios sobre AML (acute myelogenous leukaemia, leucemia mielógena aguda) donde unas células iniciadoras de tumores de baja frecuencia demostraron parecerse a células hematopoyéticas normales (HSCs). Estos estudios han sugerido que las células madre de leucemia eran los descendientes directos de HSC o el producto de una célula más diferenciada que había

adquirido rasgos de HSC. El descubrimiento de células madre fuera del sistema sanguíneo dio origen a la posibilidad de que los cánceres de residuos sólidos también pueden contener células similares a células madre. La existencia y aislamiento de células similares a células madre, iniciadoras de tumores, presentes en tumores sólidos, fueron demostrados inicialmente en tejido de cáncer de mama humano, enfoque éste que también ha sido aplicado a tumores del SNC.

Recientemente varios grupos han informado sobre la capacidad de células derivadas de tejido de glioma humano de generar células similares a neuroesferas en cultivo, confirmando la presencia de NSCs dentro de tumores del SNC. Es interesante observar que en base al aislamiento, en base a FACS (fluorescence activated cell sorting) de células de "poblaciones laterales", que la cepa de células de glioma C6 bien establecida contiene una población menor de células formadoras de neuroesferas que conservan un carácter maligno *in vivo*. Galli y colegas (Galli et al., Cancer Research (2004) 64: 7011-7021) informaron sobre el aislamiento, la propagación y la transportación en serie de células madre neurales de tumores (tNSCs) a partir de glioblastoma multiforme humano (GBM) que presenta propiedades funcionales casi idénticas a las NSC derivadas del SNC embrionario y adulto. Estas GBM tNSCs son precursores positivos de la prominina, que presentan los hallazgos críticos de las células madre neurales *in vitro*, pueden expandirse de una manera estable, y por medio de ciclos en serie de trasplantes y cultivos reproducen las características iniciales iniciadoras de tumores. En su conjunto, estos estudios respaldan fuertemente la hipótesis de que los tumores del SNC que contienen una población de células madre pueden ser responsables del inicio y la malignidad de los tumores. Las tNSCs pueden seleccionarse de entre otras células GBM utilizando FACS en virtud de la expresión de las tNSCs de CD133 (Singh et al., Nature (2004) 432:396-401).

El GBM es el tumor cerebral adulto más común, con un tiempo de supervivencia medio de 9-12 meses. La gran mayoría de los pacientes mueren a los dos años a partir de la fecha del diagnóstico. Esencialmente no hay cura, y la terapia de administración se basa comúnmente en una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia. Los coeficientes de supervivencia han variado muy poco durante los últimos 30 años, lo que ha dado origen a una búsqueda activa de nuevos tratamientos tales como terapia genética, antiangiogénesis, inmunoterapia e inhibidores de transducción de moléculas pequeñas. El documento WO00/40264 describe una citotoxina quimérica que comprende una fracción de unión del receptor IL 13 para la inhibición del crecimiento de tumores que tienen receptores específicos IL 13, incluido el glioblastoma multiforme

LIF

El LIF (Leukemia inhibitory factor, factor inhibidor de la leucemia) es una glicoproteína citoquina polifuncional cuya producción inducible puede tener lugar en muchos tejidos, tal vez en todos ellos. El LIF recibe a veces también la denominación de CDF (Cholinergic Differentiation Factor, Factor de Diferenciación Colinérgico). El LIF actúa sobre las células responsivas por el hecho de unirse a un receptor de membrana heterodimérico compuesto de LIFR (low-affinity LIF-specific receptor, receptor específico de baja afinidad de LIF) y la cadena receptora de gp130 también utilizada como el receptor para interleuquina-6, oncostatina M, cardiotrofina-1, y factor neurotrófico ciliar. El LIF es esencial para la implantación de los blastocistos y para el desarrollo normal de las neuronas receptoras del hipocampo y olfatorias. El LIF se utiliza ampliamente en biología experimental debido a su capacidad clave de inducir a las células madre embrionarias de conservar su totipotencialidad. El LIF tiene un amplio conjunto de acciones, inclusive el actuar como un estímulo para la formación de las plaquetas, proliferación de algunas células hematopoyéticas, formación de los huesos, transporte de los lípidos adipocíticos, producción de hormona adrenocorticotrópica, supervivencia y formación neuronal, proliferación celular de los músculos satelitales, la producción en fase aguda por los hepatocitos (para una revisión, ver: Metacalf, Stem Cells 2003; 21:5-14). Halfter et al. (Journal of Neuro Oncology 1998, 39:1-18) describen que LIF inhibe el crecimiento de líneas celulares de glioma humano.

BMP

Las proteínas morfogenéticas (BMPs) son miembros de la superfamilia TGF-h (Hoodless et al., Cell 85:489-500, 1996). Se conocen más de 20 miembros que pueden ser subagrupados de acuerdo con la homología en su secuencia (Hoodless et al., supra, Wozney et al. J Cell Sci, Suppl 13:149-156,1990). Las BMPs desempeñan papeles esenciales en el desarrollo embrionario. Por ejemplo, influyen sobre la gastrulación, neurogénesis, apoptosis y hematopoyesis (ver: Nohe et al., Cellular Signalling 16, 291-299 (2004) para una revisión). A continuación, los receptores de BMP llevan la denominación de BMPRs. Los BMPRs procedentes de humanos incluyen BMPR1a, BMPR1b, y BMPR2.

De acuerdo con la reciente descripción, se ha descubierto ahora que el LIF y las BMPs regulan la supervivencia de células progenitoras y de células madre, su autorrenovación, proliferación y/o diferenciación, y en particular pueden reducir el número de células proliferantes en los tejidos cancerosos.

Compendio de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 11 adjuntas.

En un aspecto, la descripción proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno caracterizados por proliferación celular excesiva o mal regulada. Los métodos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de un factor inhibidor de leucemia (LIF) y/o al menos una preparación de proteína morfogenética ósea (BMP) a un sujeto o tejido pensado para someterse a tal proliferación

celular excesiva o mal regulada.

5 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para reducir el crecimiento de un tumor que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de un factor inhibidor de leucemia (LIF) y/o una preparación de proteína morfogenética ósea (BMP) a dicho tumor. Se incluye un método para reducir el crecimiento de un tumor en un paciente humano, incluyendo tumores cerebrales (por ejemplo, glioblastoma multiforme) por administración de una preparación de BMP-4 a un paciente humano.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de reducción de la cantidad de células madre tumorales y/o células progenitoras tumorales en un tumor que comprende poner en contacto el tumor con una preparación de LIF y/o una preparación de BMP.

10 En otro aspecto, la descripción proporciona preparaciones de LIF y preparaciones de BMP que son capaces de incrementar la señalización mediada por el receptor de LIF (LIFR) o la señalización mediada por el receptor de BMP (BMPR), respectivamente, en una célula madre tumoral o una célula progenitora tumoral.

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona agentes, de ahora en más, mencionados como "activadores de la señalización de LIFR" y "activadores de la señalización del receptor de LIF" que son capaces de incrementar la señalización mediada por el receptor de LIF (LIFR) en una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de reducción del crecimiento de un tumor al incrementar la señalización mediada por LIFR o BMPR en dicho tumor. La señalización mediada por LIFR se puede activar, por ejemplo, usando una preparación de LIF y/o un activador de señalización de LIFR; la señalización mediada por BMPR se puede activar, por ejemplo, usando una preparación de BMP y/o un activador de la señalización de BMPR.

20 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para la identificación de activadores de la señalización de LIFR y activadores de señalización de BMPR.

25 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno caracterizados por proliferación celular excesiva o mal regulada. Los métodos implican la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de activador de señalización de LIFR y/o activador de señalización de BMPR a un sujeto o tejido pensado para someterse a tal proliferación celular excesiva o mal regulada.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de reducción de la cantidad de células madre tumorales y/o células progenitoras tumorales en un tumor que comprende poner en contacto el tumor con un activador de señalización de LIFR y/o un activador de señalización de BMPR.

30 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para reducir el crecimiento de un tumor que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un activador de señalización de LIFR y/o un activador de señalización de BMPR a dicho tumor.

35 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para reducir la probabilidad de que una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral se someta a división simétrica, que comprende poner en contacto la célula madre tumoral o célula progenitora tumoral con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en una preparación de LIF, una preparación de BMP, un activador de señalización de BMPR y un activador de señalización de LIFR.

En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para reducir la frecuencia de las células madre neurales y la frecuencia de las células progenitoras neurales en células madre neurales pasadas en serie que comprenden poner en contacto las células madre neurales con una preparación de LIF y/o una preparación de BMP.

40 En otro aspecto, la descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en una preparación de LIF, una preparación de BMP, un activador de señalización de BMPR y un activador de señalización de LIFR.

En un aspecto adicional, se describe el uso de la preparación BMP o LIF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor, incluyendo el uso de una preparación de un BMP-4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de tumores cerebrales (por ejemplo, glioblastoma multiforme).

45 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para el tratamiento de tumores que comprenden células madre tumorales, que comprenden poner en contacto las células madre tumorales con un agente que induce diferenciación de las células madre tumorales. Los agentes de diferenciación apropiados incluyen preparaciones de LIF, preparaciones de BMP, activadores de señalización de BMPR y activadores de la señalización de LIFR. Por ejemplo, un glioblastoma multiforme se puede tratar de acuerdo con los métodos de la descripción por contacto de las células madre neurales tumorales en el tumor (o las remanentes en la cavidad de resección luego de citorreducción quirúrgica del tumor) con una preparación de BMP-4 en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de las células madre neurales tumorales.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra un gráfico del número total teórico de células al final de cada pasaje vs. el número de pasajes para células madre neurales humanas. La Figura 1B muestra el log del número total de células al final de cada pasaje vs. el número de pasaje y una línea de tendencia de mejor ajuste para el gráfico log lineal.

5 La Figura 2A muestra un gráfico del número total teórico de células al final de cada pasaje vs. el número de pasaje para células madre neurales humanas con y sin la adición de LIF. La Figura 2B muestra el log del número total de células al final de cada pasaje vs. el número de pasaje y una línea de tendencia de mejor ajuste para el gráfico log lineal. La Figura 2C muestra gráficamente la reducción en la frecuencia de células madre y de células progenitoras en la presencia de LIF.

10 La Figura 3A ilustra una vista 20X de contraste de fase de una neuroesfera de células tumorales. La Figura 3B ilustra la cantidad teórica total de células en cada división para dos cepas de línea de GBM diferentes.

La Figura 4A muestra un gráfico de la cantidad total teórica de células al final de cada pasaje vs. el número de pasaje para células tumorales de GBM pasadas en serie. La Figura 4B muestra el log del número total de células al final de cada pasaje vs. el número de pasaje y una línea de tendencia de mejor ajuste para el gráfico log lineal. La Figura 4C muestra gráficamente la frecuencia de las células madre tumorales y de las células progenitoras tumorales.

15 El gráfico principal de la Figura 5 muestra el porcentaje de células aplicadas (eje y) que forman colonias en los siguientes intervalos de tamaños de diámetro en el NCFCA (Neural Colony Forming Cell Assay, Ensayo de Células Formadoras de Colonias Neuronales) para células tumorales GBM pasadas en serie: 1500-2000 μm ; 1000-1500 μm ; 500- 1000 μm ; y < 500 μm). El inserto en el rasgo principal de la Figura 5 muestra el porcentaje de células totales aplicadas (eje y) que forman colonias en las categorías de los diámetros 1500-2000 μm y 1000-1500 μm , utilizándose un eje y con una escala diferente de la del gráfico principal.

20

La Figura 6 muestra resultados de PCR en tiempo real en especímenes de tumor humano primario y de cepas de células madre neurales de tumores humanos para BMPR1a, BMPR1b y BMPR2.

La Figura 7 ilustra el porcentaje de células madre y de células progenitoras tratadas con LIF o BMP-4.

25 La Figura 8 ilustra el porcentaje de células madre y de células progenitoras en cepas de células GBM tratadas con LIF, BMP-4 o LIF+BMP-4.

La Figura 9 ilustra el porcentaje de células madre y de células progenitoras en cepas de células GBM tratadas con BMP-2 durante el pasaje en serie o tratadas con BMP-2 transitoriamente para un pasaje ("pos BMP").

30 La Figura 10 ilustra el GBM en ratones inmunodeficientes usados por el trasplante de células madre neurales tumorales procedentes de GBM humano (panel superior) y también ilustra que la formación de GBM se reduce cuando las células madre neurales tumorales humanas son tratadas preliminarmente con BMP-4 o LIF antes del trasplante (panel inferior).

35 La Figura 11A ilustra niveles del transcrito para BMPR1A, BMPR1B, BMPR2 y BMP-4 para células de GBM agudamente disociadas y cultivadas. La Figura 11B-D ilustra la inmunorreactividad de BMPR1A, BMPR1B, y BMPR2 en células GBM recién aisladas. La Figura 11E-G ilustra la inmunorreactividad de BMPR1A, BMPR1B y BMPR2 en células GBM cultivadas. La Figura 11H-I ilustra la inmunorreactividad de fosfoSmad 1,5,8 en células GBM. La Figura 11K-P muestra análisis de transferencia Western de BMP-4, Smad1, phosphoSmad 1,5,8 y Smad 4 en células GBM.

40 La Figura 12A muestra mediciones de muerte celular, apoptosis, inmunorreactividad de Ki67 e inmunorreactividad de CD133 en cultivos de GBM en la presencia y ausencia de BMP-4. La Figura 12B muestra el índice clonogénico de células GBM en la presencia y ausencia de BMP-4. La Figura 12C ilustra la propagación de las células GBM en el Ensayo de Neuroesfera en presencia y ausencia de BMP-4.

45 La Figura 13A ilustra células GBM en la ausencia de BMP-4. La Figura 13B ilustra células GBM cultivadas con BMP-4. La Figura 13C (células GBM de control) y la Figura 13D (células GBM tratadas con BMP-4) muestran una inmunorreactividad de GFAP (IR); la Figura 13E (células GBM de control) y la Figura 13F (células GBM tratadas con BMP-4) muestran β III-tubulina IR; la Figura 13G (células GBM de control) y la Figura 13H (células GBM tratadas con BMP-4s) muestran GalC IR. La Figura 13I-K muestra el análisis citofluorométrico de células GBM de control y células GBM tratadas con BMP-4 para GFAP IR, β III-tubulina IR y GalC IR.

50 La Figura 14A muestra una masa tumoral en ratones que recibieron inyecciones de células GBM no tratadas. La Figura 14B muestra la ausencia de una masa tumoral comparable en ratones que recibieron inyecciones de células GBM tratadas con BMP-4. La Figura 14C muestra tumores en ratones tratados juntamente con perlas de control que carecen de BMP-4. La Figura 14D muestra la ausencia de tumores comparables en ratones tratados juntamente con perlas de BMP-4. La Figura 14E muestra tumores en ratones postratados con perlas de control. La Figura 14F muestra la ausencia de tumores comparables en ratones postratados con perlas de BMP-4. La Figura 14G muestra la morfología celular de tumores de GBM no tratados en ratones. La Figura 14H muestra la morfología celular de tumores de GBM tratado con BMP-4 en ratones. La Figura 14J muestra gráficos de supervivencia para ratones que decidieron GBM tratados antes (panel izquierdo), simultáneamente (panel central) y posteriormente (panel derecho) de inyección

55

de GBM con perlas de control o perlas de BMP-4.

La Figura 15 ilustra los efectos de varios BMPs sobre el crecimiento de las células GBM.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

5 Antes de describir la presente descripción en detalle, se ha de entender que, a menos que se indique otra cosa, la descripción objeto no se limita a componentes de formulación, métodos de fabricación, regímenes posológicos específicos, o similares, ya que ellos pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en la presente es con fines de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitativa.

10 Se debe observar que, cuando se usa en la memoria descriptiva objeto, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen aspectos plurales, a menos que el contexto claramente dictamine otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a “agente” incluye un agente simple, así como dos o más agentes; la referencia a una “célula madre” incluye una célula madre única, así como a dos o más células madre; etc.

15 Como se usa en la presente memoria, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a aquella cantidad de un agente terapéutico suficiente para tratar o controlar una enfermedad o un trastorno caracterizados por proliferación celular excesiva o mal regulada y, preferiblemente, la cantidad suficiente para destruir, modificar, controlar o remover tejido canceroso primario, regional o metastásico. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o minimizar el inicio de la enfermedad o el trastorno caracterizados por proliferación celular excesiva o mal regulada, por ejemplo, retardar o minimizar la difusión del cáncer o el crecimiento de un tumor. Una cantidad terapéuticamente eficaz también se puede referir a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o el control de un tumor o de cáncer. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la descripción significa que aquella cantidad de agente terapéutico solo o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o el control de una enfermedad celular hiperproliferativa o cáncer. El término puede comprender una cantidad que mejora la terapia en general, reduce o evita efectos no deseados o mejora la eficacia terapéutica o las sinergias con otro agente terapéutico.

25 Las expresiones “agente”, “compuesto”, “agente activo”, “compuesto activo”, “agente terapéutico”, “agente farmacológicamente activo”, “medicamento”, “activo” y “fármaco” se usan indistintamente en la presente para referirse a una sustancia que induce un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Los términos también comprenden ingredientes farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activos de aquellos agentes activos específicamente mencionados en la presente, que incluyen, pero sin limitación, sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos activos, análogos, y similares. Cuando se usan las expresiones “agente”, “compuesto”, “agente activo”, “agente farmacológicamente activo”, “medicamento”, “activo” y “fármaco”, entonces se ha de entender que incluye el agente activo per se, así como sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos, análogos farmacéuticamente aceptables, farmacológicamente activos, etc. Los agentes de la presente descripción pueden ser cualquier molécula proteínica tal como péptidos, polipéptidos y proteínas o moléculas no proteínicas tales como moléculas de ácido nucleico y moléculas orgánicas e inorgánicas naturales o sintéticamente derivados pequeñas a grandes. Los agentes pueden atravesar en general la barrera hematoencefálica o pueden ser apropiados para dirigir la administración al SNC.

40 La referencia en la presente al “tratamiento” puede significar una reducción en la gravedad de una enfermedad o condición existentes. El término “tratamiento” también se toma para abarcar un “tratamiento profiláctico” para prevenir el inicio de una enfermedad o condición. El término “tratamiento” no implica necesariamente que un sujeto esté tratado hasta la recuperación total. De modo similar, “tratamiento profiláctico” no significa necesariamente que el sujeto contraerá eventualmente una enfermedad o condición.

45 “Célula madre” como se usa en la presente memoria se refiere a una célula no diferenciada capaz de (a) proliferar, (b) autorrenovarse durante un período de tiempo extendido, (c) generar una gran cantidad de progenie y (d) dar origen a todos los tipos celulares del tejido del que se obtiene.

50 Como se usa en la presente memoria, una “célula madre tumoral” es una célula madre obtenida de un tumor. Una célula madre tumoral es capaz de (a) proliferar, (b) autorrenovarse durante un período de tiempo extendido, (c) generar una gran cantidad de progenie y (d) dar origen a todos los tipos celulares del tejido del que se obtiene. Una “célula madre neural tumoral”, también mencionada como una “tNSC”, se refiere a una célula madre tumoral obtenida de un tumor del SNC.

“Célula progenitora” como se usa en la presente memoria se refiere a una célula no diferenciada capaz de (a) proliferar, (b) autorrenovarse de modo limitado, (c) generar una cantidad limitada de progenie y (d) dar origen a al menos un tipo de progenie.

55 Como se usa en la presente memoria, una “célula progenitora tumoral” es una célula progenitora obtenida de un tumor. Una célula progenitora tumoral es capaz de (a) proliferar, (b) autorrenovarse de modo limitado, (c) generar una cantidad limitada de progenie y (d) dar origen a al menos un tipo celular hallado en el tumor del que se obtiene.

Preparaciones de LIF y preparaciones de BMP

5 En un aspecto, la descripción proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno caracterizados por proliferación celular excesiva o mal regulada. Los métodos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de un factor inhibidor de leucemia (LIF) y/o al menos una preparación de proteína morfogenética ósea (BMP) a un sujeto o tejido pensado para someterse a tal proliferación celular excesiva o mal regulada.

10 Preferiblemente, el trastorno caracterizado por una excesiva proliferación es un tumor benigno o un tumor maligno (cáncer). Por ejemplo, el tumor puede ser un tumor cerebral que incluye, pero sin limitación, neuroma acústico, adenoma, astrocitoma, astrocitoma pilocítico juvenil, glioma del tronco encefálico, cordoma, plexo coroide, craneofaringioma, ependimoma, ganglioglioma, ganglioglioneurocitoma, glioblastoma multiforme (GBM), glioma, linfoma, meduloblastoma, meningioma, oligodendroglioma, glioma del nervio óptico, tumores de la pituitaria, tumores pineales o pineoblastoma. En realizaciones preferidas, el tumor cerebral es GBM.

15 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para reducir el crecimiento de un tumor que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de un factor inhibidor de leucemia (LIF) y/o al menos una preparación de proteína morfogenética ósea (BMP) a dicho tumor. En algunas realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de BMP-4 a GBM en un paciente humano para reducir el crecimiento del GBM.

20 En otro aspecto, la descripción proporciona un método de reducción de la cantidad de células madre tumorales y/o células progenitoras tumorales en un tumor que comprende poner en contacto el tumor con una preparación de LIF y/o una preparación de BMP. Sin quedar ligados por la teoría o hipótesis, se cree que, cuando se administran a un tumor, las preparaciones de LIF y las preparaciones de BMP llevan a un aumento en la señalización mediada por LIFR o BMPR, que da como resultado la modulación de una o más de las siguientes propiedades de las células madre tumorales o células progenitoras tumorales tales como, pero sin limitación, propiedades de supervivencia celular, autorrenovación, división simétrica, proliferación y/o diferenciación. En particular y sin quedar limitados por la teoría o hipótesis, se cree que un incremento en la señalización mediada por LIFR o BMPR da como resultado una reducción en las propiedades de proliferación de las células madre y progenitoras y en particular una reducción en la probabilidad de división simétrica exhibida por las células madre o las células progenitoras proliferantes, reduciendo así sus cantidades. Por consiguiente, en otro aspecto, la descripción proporciona un método para reducir la probabilidad de que una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral se someta a división simétrica, método que comprende poner en contacto la célula madre tumoral o célula progenitora tumoral con una preparación de LIF y/o una preparación de BMP.

35 En otro aspecto, la descripción proporciona un método de reducción del el crecimiento de un tumor por aumento de la señalización mediada por LIFR o BMPR en dicho tumor. La señalización mediada por LIFR se puede activar, por ejemplo, usando una preparación de LIF y/o un activador de señalización de LIFR (ver más abajo); la señalización mediada por BMPR se puede activar, por ejemplo, usando una preparación de BMP y/o un activador de señalización de BMPR (ver más abajo).

40 Los actuales tratamientos destinados a erradicar las células tumorigénicas usando tratamientos convencionales se diseñan para eliminar células de ciclo rápido. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos tradicionales son más eficaces contra células que se dividen. Como su contraparte no transformada, las tNSCs se ciclan con poca frecuencia y, así, se escapan de los efectos tóxicos del tratamiento y pueden reiniciar con facilidad la expansión tumoral después del tratamiento. La longevidad intrínseca de las células madre adultas y su capacidad inherente de expresar la resistencia a los fármacos y los genes antiapoptóticos se puede hallar en su contraparte maligna, agravando la dificultad para desarrollar estrategias eficaces de tratamiento destinadas a erradicar las células madre tumorales. Los métodos y las composiciones revelados en la presente memoria superan esta dificultad al dirigirse a las células tNSC.

45 Sin quedar ligados por la teoría o hipótesis, se cree que los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria tienen un efecto de prodiferenciación sobre las tNSCs (como se evidencia por la regulación hacia arriba de marcadores de diferenciación neurales, en particular antígenos astrogliales, como se muestra en los Ejemplos) y, de esta manera, reducen de modo permanente el pool de células madre sin afectar la viabilidad celular o producir apoptosis. Como resultado (como se muestra en los Ejemplos de abajo), incluso una exposición transitoria a las composiciones de la descripción (en particular, composiciones de BMP-4 para el tratamiento de GBM) inhibe de modo irreversible el potencial tumorigénico de las tNSCs.

55 La inducción de la diferenciación de células tumorales, más que intentar matarlas, es un enfoque totalmente nuevo para el tratamiento del cáncer. De esta manera, en otro aspecto, la descripción proporciona un método de tratamiento de un tumor que comprende células madre tumorales, que comprende poner en contacto las células madre tumorales con un agente (como una preparación de BMP) que induce su diferenciación. En una de tales realizaciones, las células madre neurales tumorales en un tumor cerebral como glioblastoma multiforme, se ponen en contacto con BMP-4 para inducir su diferenciación.

Las expresiones “preparación de LIF” y “preparación de BMP” incluyen el polipéptido de LIF o un polipéptido de BMP como se produce en la naturaleza, preferiblemente en seres humanos, con o sin ninguna modificación

postransduccional. Esto incluye, para LIF humano, el polipéptido codificado por el mRNA que tiene el número de acceso a GenBank NM_002309. Para BMPs humanos, esto incluye los polipéptidos de BMP codificados por los genes humanos: BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, GDF10 (BMP-3b), GDF11 (BMP11), GDF2 (BMP9), BMP10, BMP15 y por los mARNs que tienen los números de acceso a GenBank: NM_001719 (BMP7);
 5 NM_001201 (BMP3); NM_001200 (BMP2); NM_005448 (BMP15); NM_001720 (BMP8B); NM_014482 (BMP10); NM_006132 (BMP1-4); NM_006131 (BMP1-5); NM_006130 (BMP1-6); NM_006129 (BMP1-3); NM_006128 (BMP1-2); NM_001718 (BMP6); NM_001199 (BMP1-1); NM_130851 (BMP4-3); NM_130850 (BMP4-2); NM_001202 (BMP4-1); NM_181809 (BMP8A); NM_021073 (BMP5). Observar que el polipéptido BMP-4 también a veces se menciona como BMP-2B.

10 Las BMPs preferidas para usar en los métodos y las composiciones de la descripción incluyen BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 y BMP-8b. En particular, la exposición a BMP-4 se muestra en los Ejemplos de abajo para reforzar la maduración de las células aisladas GBM humano mientras no afecten la viabilidad general y la apoptosis. Esto da como resultado la regulación hacia arriba de marcadores neuronales y gliales y también da como resultado una mayor
 15 reducción en la capacidad de proliferación. La exposición a BMP-4 —incluso transitoriamente— se muestra en los Ejemplos de abajo para reducir en gran medida el tamaño de las poblaciones de tNSCs de GBM (células CD133+ de GBM) en cultivos de GBM, para reducir ampliamente el índice clonogénico de células de GBM y reducir dramáticamente la cinética de expansión de las tNSCs de GBM. Estos efectos son irreversibles y extinguen la capacidad de inicio de tumores in vivo de células de GBM humano.

20 La expresión “preparación de LIF” o “preparación de BMP” como se usa en la presente memoria también incluye fragmentos de polipéptidos de LIF o BMP o glicopolipéptidos que retienen al menos parcialmente la capacidad de atenuar una proliferación celular excesiva en los ensayos y métodos de tratamiento de la descripción, por ejemplo, que retienen entre el 1-100% de la actividad de LIF de longitud total o un BMP de longitud total en los ensayos o métodos de tratamiento de la descripción. Estos fragmentos pueden tener mayor actividad respecto del LIF de longitud total o un BMP de longitud total en los ensayos o métodos de tratamiento de la descripción. Estos fragmentos pueden tener una
 25 serie continua de residuos delecionados del término amino o carboxi o ambos, en comparación con la proteína de longitud total. Los fragmentos se pueden caracterizar por dominios estructurales o funcionales, tales como fragmentos que comprenden hélice alfa y regiones que forman la hélice alfa, hoja beta y regiones que forma la hoja beta, vuelta y regiones que forman vueltas, espiral y regiones que forman espirales, regiones hidrofílicas, regiones hidrofóbicas, regiones anfipáticas alfa, regiones anfipáticas beta, regiones flexibles, regiones formadoras de superficie y regiones que se unen con sustrato. Los fragmentos se pueden producir por técnicas de síntesis de péptidos o por escisión de polipéptido de LIF o BMP de longitud total. Los fragmentos se pueden ligar en sus términos N, términos C o tanto su término N como C con otras secuencias de polipéptidos, formando así proteínas de fusión.

30 La expresión “preparación de LIF” o “preparación de BMP” como se usa en la presente memoria también incluye un polipéptido o glicopolipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es parcialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de LIF o BMP o uno de sus fragmentos, como se reveló con anterioridad y que retiene al menos parcialmente la capacidad de atenuar una excesiva proliferación celular en los ensayos y los métodos de tratamiento de la descripción. Los homólogos pueden ser un 50%, 70%, 80%, 80,6%, 83%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9% idénticos a LIF o BMP o fragmentos de ellos.

40 La expresión “preparación de LIF” o “preparación de BMP” también incluye variantes de polipéptido de longitud total de LIF o BMP y variantes de fragmentos de LIF o BMP. Estas variantes retienen al menos parcialmente la capacidad de atenuar la excesiva proliferación celular en los ensayos y métodos de tratamiento de la descripción. Las variantes pueden incluir deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas de acuerdo con las reglas generales conocidas en la técnica de modo que tienen poco efecto sobre la actividad. Por ejemplo, se proporciona una guía referente a cómo preparar sustituciones de aminoácidos fenonormalmente silenciosos en Bowie et al., Science 247: 1306-1310 (1990). Por ejemplo, se pueden obtener variantes por mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis por exploración de alanina (introducción de mutaciones simples de alanina en cada residuo en la molécula) (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989). Las variantes también pueden tener sustituciones de aminoácidos que contienen, por ejemplo, uno o más enlaces no peptídicos (que reemplazan los enlaces peptídicos)
 45 en la secuencia de proteínas o péptidos. Las variantes también pueden tener sustituciones que incluyen residuos de aminoácidos distintos de los L-aminoácidos naturales, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos no naturales o sintéticos, por ejemplo, aminoácidos B o y. Las variantes también pueden incluir grupos reticulantes que imponen limitaciones conformacionales al polipéptido. Las variantes también pueden incluir glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares. Las variantes también pueden incluir (i) sustituciones con uno o varios de los residuos de aminoácido no conservados, donde los residuos de aminoácido sustituidos pueden o no pueden estar codificados por el código genético o (ii) sustitución con uno o varios residuos de aminoácido con un grupo sustituyente o (iii) fusión del polipéptido maduro con otro compuesto, como un compuesto para incrementar la estabilidad y/o la solubilidad de la preparación de LIF o la preparación de BMP (por ejemplo, polietilenglicol) o dirigir la preparación de LIF o la preparación de BMP a un tipo celular específico (como una célula madre neural tumoral) o permitir que la preparación de LIF o la preparación de BMP atraviese la barrera hematoencefálica (BBB) y/o la barrera hematotumoral (BTB) o (iv) fusión del polipéptido con aminoácidos adicionales o péptidos adicionales o polipéptidos adicionales o (v) fusión con un agente citotóxico, por ejemplo, una toxina o compuesto radiactivo o (vi) fusión con un marcador que se puede usar con fines de imágenes, por ejemplo, un radiorrótulo.

Las preparaciones de LIF y las preparaciones de BMP de la descripción se pueden obtener de cualquier manera apropiada, incluyen por aislamiento de polipéptidos naturales, por técnicas recombinantes, por técnicas de síntesis de polipéptidos o por una combinación de estos métodos. Los métodos para preparar tales polipéptidos son bien conocidos en la técnica. Las preparaciones de LIF o las preparaciones de BMP pueden estar en forma de una proteína más grande como una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias secretoras o líderes, prosecretoras, secuencias que ayudan a la purificación, como residuos de histidina múltiples o una secuencia adicional para estabilidad durante la producción recombinante.

Las preparaciones de LIF y las preparaciones de BMP de la presente descripción se proporcionan preferiblemente en una forma aislada y, con preferencia, están sustancialmente purificadas. Una versión producida en forma recombinante de una preparación de LIF o una preparación de BMP se puede purificar sustancialmente usando técnicas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica, tales como, por ejemplo, por el método de una etapa descrito en Smith and Johnson, Gene 67: 31-40 (1988). Las preparaciones de LIF o de BMP de la descripción también se pueden purificar de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes usando protocolos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, anticuerpos de la descripción contra LIF o BMP de longitud total.

En algunas realizaciones de la presente descripción, una preparación de LIF y/o una preparación de BMP se pueden administrar a un sujeto directamente, de modo tal que las células madre tumorales y células progenitoras tumorales endógenas se regulan in vivo. Por ejemplo, una preparación de BMP-4 se puede administrar a un tumor cerebral como GBM, en un paciente humano. En realizaciones alternativas de la presente descripción, las células madre tumorales y las células progenitoras tumorales se pueden poner en contacto con los agentes de la presente descripción in vitro. Por ejemplo, un tumor aislado que comprende células madre tumorales y células progenitoras tumorales se puede poner en contacto con los agentes de la descripción in vitro.

Los métodos de administración de las preparaciones de LIF y/o las preparaciones de BMP a un sujeto, incluyendo un tumor en un sujeto, junto con composiciones farmacéuticas que comprenden preparaciones de LIF y/o preparaciones de BMP, se proporcionan más abajo en la sección intitulada "Administración y composiciones farmacéuticas".

Activadores de señalización del receptor de LIF y activadores de la señalización del receptor de BMP

En otro aspecto, la presente descripción proporciona agentes, denominados en la presente memoria como "activadores de la señalización de LIFR" y "activadores de la señalización del receptor de LIF" que son capaces de incrementar la señalización mediada por el receptor de LIF (LIFR) en una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral. La descripción también proporciona métodos para la identificación de tales activadores de la señalización de LIFR y composiciones farmacéuticas que comprenden tales activadores de la señalización de LIFR. Los activadores de la señalización de LIFR de la presente descripción pueden incrementar la señalización mediada por LIFR una célula madre o progenitora por activación de LIFR directamente (por ejemplo, un agonista) o indirectamente, como por incremento de la expresión o la actividad de una molécula o compuesto secundarios (por ejemplo, por incremento de la expresión de LIF propiamente dicha o por incremento de la actividad o la expresión de un componente corriente debajo de la señalización mediada por LIFR, como JAK o STAT) en la célula madre tumoral o la célula progenitora tumoral que, a su vez, incrementa la señalización mediada por LIFR en una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona agentes, de ahora en más mencionados como "activadores de señalización de BMPR" y "activadores de la señalización del receptor de BMP" que son capaces de incrementar la señalización mediada por el receptor de BMP (BMPR) en una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral. La descripción también proporciona métodos para la identificación de tales activadores de señalización de BMPR y composiciones farmacéuticas que comprenden tales activadores de señalización de BMPR. Los activadores de señalización de BMPR de la presente descripción pueden incrementar la señalización mediada por BMPR en una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral por activación de BMPR directamente (por ejemplo, un agonista) o indirectamente, como por incremento de la expresión o la actividad de una molécula o compuesto secundarios (por ejemplo, por incremento de la expresión de BMP propiamente dicha o por incremento de la expresión o actividad de un componente corriente debajo de la señalización mediada por BMPR) en la célula madre tumoral o célula progenitora tumoral que, a su vez, aumenta la señalización mediada por BMPR en una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral.

La referencia en la presente memoria a "LIFR" incluye la referencia a todas las formas de LIFR tales como homólogos, parálogos, ortólogos, derivados, fragmentos y equivalentes funcionales de LIFR. La referencia en la presente memoria a "BMPR" incluye la referencia a todas las formas de BMPR tales como homólogos, parálogos, ortólogos, derivados, fragmentos y equivalentes funcionales de BMPR.

En el contexto de la presente descripción, un incremento en la señalización mediada por LIFR o BMPR se refiere a un incremento de uno a aproximadamente el 1000% del nivel normal de señalización mediada por LIFR o BMPR. Alternativamente, el activador de señalización de LIFR o BMPR puede regresar el nivel de señalización mediada por LIFR o BMPR a normal en casos en los que la señalización es inferior a lo normal.

Preferiblemente, el incremento de la señalización mediada por LIFR o BMPR resulta en la modulación de una o más propiedades de células madre tumorales y células progenitoras tumorales tales como, pero sin limitación, propiedades

de supervivencia, autorrenovación, proliferación, división simétrica y/o diferenciación. Con máxima preferencia, el incremento de la señalización mediada por LIFR o BMPR altera las propiedades de división de las células madre tumorales y las células progenitoras tumorales y en particular una reducción en la probabilidad de división simétrica o reducción en la frecuencia del ciclo celular exhibido por las células madre tumorales y células progenitoras tumorales proliferantes, llevando así a una reducción de la cantidad de células madre tumorales y células progenitoras tumorales.

Los activadores de señalización de LIFR y de BMPR de la descripción pueden ser cualquier molécula proteínica tales como péptidos, polipéptidos y proteínas o pueden ser moléculas no proteínicas. Los métodos para el aislamiento de activadores de señalización de LIFR y BMPR se proporcionan en la presente memoria.

En relación con la presente descripción, los miméticos son un grupo particularmente útil de activadores de señalización de LIFR y BMPR. El término pretende referirse a una sustancia que tiene cierta similitud química con la molécula que imita, tales como, por ejemplo, LIF, pero que agoniza (imita) su interacción con un blanco, como, por ejemplo, un LIFR. Un mimético de péptido es una clase de miméticos y puede ser una molécula que contiene péptido que imita los elementos de la estructura secundaria de la proteína (Johnson et al., *Peptide Turn Mimetics in Biotechnology and Pharmacy*, Pezzuto et al., Eds., Chapman and Hall, New York, 1993). El razonamiento subyacente detrás del uso de miméticos peptídicos es que la estructura del péptido de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de aminoácidos de modo tal que facilite las interacciones moleculares como aquellas de anticuerpo y antígeno, enzima y sustrato o proteínas estructurales. Un mimético peptídico, por ende, se diseña para permitir interacciones moleculares similares a la molécula natural.

El diseño de los miméticos en un compuesto farmacéuticamente activo es un conocido enfoque para el desarrollo de productos farmacéuticos en base a un compuesto "de guía". Esto puede ser deseable cuando el compuesto activo es difícil o costoso para sintetizar o cuando es inapropiado para un método particular de administración, por ejemplo, péptidos son agentes activos inapropiados para composiciones orales porque tienden a degradarse rápidamente por las proteasas en el canal alimentario. El diseño, la síntesis y el ensayo de los miméticos se usa en general para evitar el control aleatorio de grandes cantidades de moléculas para una propiedad diana. Un mimético de BMP-4, incluyendo un mimético peptídico, por ejemplo, se contempla específicamente en la presente.

El objeto del diseño farmacológico racional consiste en producir análogos estructurales de polipéptidos de interés biológicamente activos o de pequeñas moléculas con las que interactúan para elaborar fármacos que, por ejemplo, son formas más activas o estables del polipéptido o que, por ejemplo, mejoran o interfieren con la función de un polipéptido in vivo (ver, por ejemplo, Hodgson, *Bio/Technology* 9:19-21, 1991). En un enfoque, uno determina primero la estructura tridimensional de una proteína de interés por cristalografía por rayos X, por modelaje por ordenador o más normalmente, por una combinación de enfoques. La información de utilidad respecto de la estructura de un polipéptido también se puede obtener por modelaje en base a la estructura de proteínas homólogas. Un ejemplo del diseño farmacológico racional es el desarrollo de inhibidores de HIV proteasa (Erickson et al., *Science* 249:527-533, 1990).

La capacidad de los activadores de señalización de LIFR y BMPR de la presente descripción, ya sea proteínicos o no proteínicos, de interactuar con LIFR o BMPR y/o incrementar la señalización mediada por LIFR o BMPR (ya sea directa o indirectamente) en una célula madre o célula progenitora se puede evaluar por medio de una cantidad de métodos de control que serán bien conocidos por un experto en la técnica. Ellos pueden incluir control de bibliotecas naturalmente producidas, bibliotecas químicamente producidas, así como bibliotecas combinatorias, bibliotecas de visualización de fagos y bibliotecas a base de traducción in vitro.

Los anticuerpos planteados contra LIFR y BMPR pueden ser particularmente útiles como agonistas que imitan la configuración activa de LIF y BMP, respectivamente. Los anticuerpos apropiados incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-id) y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores. El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión con antígeno que se une inmunoespecíficamente con un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Más aún, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) incluye moléculas intactas, así como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente con proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se limpian más rápidamente de la circulación del animal o la planta y pueden tener menos unión con tejido no específico que un anticuerpo intacto (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983)). Los métodos para producir agonistas de anticuerpos se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 96/40281; la patente de EE.UU. No. 5.811.097; Deng et al., *Blood* 92 (6): 1981-1988 (1998); Chen et al., *Cancer Res.* 58 (16): 3668-3678 (1998); Harrop et al., *J. Immunol.* 161 (4): 1786-1794 (1998); Zhu et al., *Cancer Res.* 58 (15): 3209-3214 (1998); Yoon et al., *J. Immunol.* 160 (7): 3170-3179 (1998); Prat et al., *J. Cell. Sci.* 111 (Pt2): 237-247 (1998); Pitard et al., *J. Immunol. Methods* 205 (2): 177-190 (1997); Liautard et al., *Cytokine* 9 (4): 233-241 (1997); Carlson et al., *J. Biol. Chem.* 272 (17): 11295-11301 (1997); Taryman et al., *Neuron* 14 (4): 755-762 (1995); Muller et al., *Structure* 6 (9): 1153-1167 (1998); Bartunek et al., *Cytokine* 8 (1): 14-20 (1996); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., en: *Monoclonal*

Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981).

Los ligandos de ácido nucleico (también conocidos como "aptámeros") también pueden ser particularmente útiles como agonistas que imitan la configuración activa de LIF y BMP, respectivamente. Por ejemplo, los aptámeros se pueden seleccionar usando el método SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk and Gold, 1990, Science 249: 505-510. En el método SELEX, se produce una gran biblioteca de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, 10^{15} diferentes moléculas) y/o se controlan con la molécula diana, en este caso, BMPR, LIFR o porciones de ellos. La molécula diana se deja incubar con la biblioteca de secuencias de nucleótidos durante un período de tiempo. Varios métodos se pueden usar luego para aislar físicamente las moléculas diana de aptámero de las moléculas no ligadas en la mezcla y las moléculas no ligadas se pueden descartar. Los aptámeros con la máxima afinidad para la molécula diana se pueden purificar luego de la molécula diana y se pueden amplificar enzimáticamente para producir una nueva biblioteca de moléculas que está sustancialmente enriquecida para aptámeros que pueden unir la molécula diana. La biblioteca enriquecida se puede usar luego para iniciar un nuevo ciclo de selección, partición y amplificación. Después de 5-15 ciclos de este proceso de selección, partición y amplificación, la biblioteca se reduce a una pequeña cantidad de aptámeros que se unen íntimamente con la molécula diana. Las moléculas individuales en la mezcla se pueden aislar luego, sus secuencias de nucleótidos se pueden determinar y sus propiedades con respecto a la afinidad de unión y especificidad se pueden medir y comparar. Los aptámeros aislados se pueden refinar luego para eliminar cualquier nucleótido que no contribuye con la unión diana y/o la estructura del aptámero (es decir, aptámeros truncados con su dominio de unión central). Ver, por ejemplo, Jayasena, 1999, CHN. Chem. 45: 1628-1650 para una reseña de la tecnología de los aptámeros.

Esencialmente cualquier compuesto químico se puede emplear como un activador de la señalización de LIFR o BMPR candidatos. Las metodologías de control de alto rendimiento se pretenden en particular para la detección de tales activadores candidatos. Estos métodos de control de alto rendimiento normalmente implican el suministro de bibliotecas combinatorias de productos químicos o péptidos que contienen una gran cantidad de compuestos terapéuticos potenciales (por ejemplo, compuestos ligandos o moduladores). Estas bibliotecas combinatorias de productos químicos o de ligandos se controlan luego en uno o más ensayos para identificar aquellos miembros de la biblioteca (por ejemplo, especies químicas o subclases particulares) que muestran una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como compuestos líderes convencionales o se pueden usar en sí mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales.

Una biblioteca de productos químicos combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados ya sea por síntesis química o síntesis biológica, por combinación de una cantidad de bloques constructivos químicos (es decir, reactivos tales como aminoácidos). Como un ejemplo, se forma una biblioteca combinatoria lineal, por ejemplo, una biblioteca de polipéptidos o péptidos, por combinación de un grupo de bloques constructivos químicos en cada forma posible para un largo de compuesto dado (es decir, la cantidad de aminoácidos en un compuesto polipeptídico o peptídico). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos por medio de tal mezcla combinatoria de bloques constructivos químicos.

La preparación y el control de las bibliotecas de productos químicos combinatorias son bien conocidos para los expertos en la técnica pertinente. Las bibliotecas combinatorias incluyen, sin limitación, bibliotecas de péptidos (por ejemplo, patente de EE.UU. No. 5.010.175; Furka, 1991, Int. J. Pept. Prot. Res., 37: 487-493; y Houghton et al., 1991, Nature, 354: 84-88). También se pueden usar otras químicas para generar bibliotecas de diversidad de productos químicos. Los ejemplos no limitativos de químicas de bibliotecas de diversidad de productos químicos incluyen, péptidos (publicación PCT N.º WO 91/019735), péptidos codificados (publicación PCT N.º WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (publicación PCT N.º WO 92/00091), benzodiazepinas (patente de EE.UU. No. 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6909-6913), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., 1992, J. Amer. Chem. Soc., 114: 6568), peptidomiméticos no peptídicos con estructura de glucosa (Hirschmann et al., 1992, J. Amer. Chem. Soc., 114: 9217-9218), síntesis orgánica análoga de pequeñas bibliotecas de compuestos (Chen et al., 1994, J. Amer. Chem. Soc., 116: 2661), oligocarbamatos (Cho et al., 1993, Science, 261: 1303), y/o peptidilfosfonatos (Campbell et al., 1994, J. Org. Chem., 59: 658), bibliotecas de ácidos nucleicos (ver Ausubel, Berger and Sambrook, todos supra), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (patente de EE.UU. No. 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (por ejemplo, Vaughn et al., 1996, Nature Biotechnology, 14 (3): 309-314) y PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (por ejemplo, Liang et al., 1996, Science, 274-1520-1522) y patente de EE.UU. No. 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, Jan. 18, 1993, página 33; y patente de EE.UU. No. 5.288.514; isoprenoides, patente de EE.UU. No. 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente de EE.UU. No. 5.549.974; pirrolidinas, patentes de EE.UU. Nos. 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, patente de EE.UU. No. 5.506.337; y similares).

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias son asequibles en comercios (por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky.; Symphony, Rainin, Woburn, Mass.; 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif.; 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Además, una gran cantidad de bibliotecas combinatorias son asequibles en comercios (por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J.; Asinex, Moscú, Rusia; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; ChemStar, Ltd., Moscú, Rusia; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences, Colombia, Md., y similares).

Los activadores de señalización de LIFR y BMPR candidatos se pueden controlar primero respecto de su capacidad de

unirse con LIFR o BMPR o componentes corriente debajo de la vía de señalización de LIFR o BMPR, usando un ensayo de unión y aquellos candidatos que se unen se pueden controlar luego en un ensayo funcional. Los ensayos de unión apropiados incluyen el ensayo de desplazamiento térmico a base de fluorescencia (3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP, Exton, Pa.) como se describe en las patentes EE.UU. Nos. 6.020.141 y 6.036.920 de Pantoliano et al.; ver también J. Zimmerman, 2000, Gen. Eng. News, 20 (8)).

Un ejemplo de un método para el control funcional de activadores de señalización de LIFR y BMPR candidatos incluye las siguientes etapas:

(i) aislar una muestra de células madre tumorales y/o células progenitoras tumorales;

(ii) colocar alícuotas de las células madre tumorales y/o células progenitoras tumorales en receptáculos apropiados; y

(iii) exponer las alícuotas de células madre tumorales y/o células progenitoras tumorales a agentes candidatos durante un período de tiempo particular y en condiciones particulares; y

(iv) controlar los cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos de las células madre tumorales y/o células progenitoras tumorales.

Los cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos incluyen el control de los estados de supervivencia, autorrenovación, proliferación y/o diferenciación. Un ejemplo de un ensayo que se puede usar es el ensayo celular de formación de colonias neurales (NCFCA) descrito en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2005/0112546. El NCFCA es capaz de distinguir células madre de células progenitoras, donde ambas tienen un potencial proliferativo y son capaces de formar esperas en cultivo en suspensión (ensayo de neuroesferas) o colonias en el NCFCA. Brevemente, las células primarias o cultivadas obtenidas de un tumor se plaquean en una matriz de colágeno 3-D libre de suero que contiene los mitógenos FGF2 y EGF. En estas condiciones de cultivo, sólo las células madre y las células progenitoras con un potencial proliferativo dividen las colonias de forma bien definida cuyo tamaño se puede medir después de 1-4 semanas. Las diferencias en el tamaño de la colonia se correlacionan positivamente con el potencial proliferativo de la célula fundadora y proporcionan una lectura de la frecuencia de las células madre y las células progenitoras. En estas condiciones, sólo las colonias de más de 2 mm de diámetro se derivan de una célula madre, mientras que aquellas de menos de 2 mm de diámetro se derivan de células progenitoras. Una lectura significativa y precisa de las células madre y las células progenitoras permite controlar los elementos genéticos y epigenéticos que alteran la frecuencia de estos dos tipos celulares.

Otro ejemplo de un ensayo para la supervivencia, la autorrenovación, la proliferación y/o la diferenciación que se puede usar para controlar los receptores de LIFR y BMPR se lleva a cabo de la siguiente manera. En primer lugar, se plaquen células de un tumor desagregado de glioblastoma multiforme en medio libre de suero con contenido de mitógenos FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) y EGF (factor de crecimiento epidérmico) como se describe por Gritti et al., J. Neurosci. (1996) 16(3): 109-1100. Este sistema de cultivo selecciona las células diferenciadas/diferenciadas de los cultivos tumorales primarios, dejando sólo las células madre tumorales libres para proliferar y expandirse exponencialmente, formando así neuroesferas primarias. Las neuroesferas primarias se pueden disociar y plaquear otra vez en medio libre de suero a una densidad clonal en presencia de EGF y FGF2 en placas de microtitulación. Los activadores de señalización de LIFR y BMPR candidatos se añaden a cada pocillo de la placa de microtitulación y las placas se incuban durante un período suficiente para permitir que las células no tratadas proliferen. Al final de la incubación, las neuroesferas se disocian otra vez y el proceso se puede repetir durante una cantidad predeterminada de pasajes adicionales en presencia de los activadores de señalización de LIFR y BMPR candidatos. Al final de la cantidad de pasajes predeterminada, los pocillos de la placa de microtitulación se pueden examinar usando un microscopio para la presencia de neuroesferas y la cantidad y el tamaño de las neuroesferas se determinan, proporcionando una medida del efecto del activador de señalización de LIFR o BMPR candidato en células madre y progenitoras. Los algoritmos matemáticos del Ejemplo 1 se pueden usar para determinar la cantidad de células madre y progenitoras al final de cada pasaje. La comparación con células no tratadas que también se habían pasado en serie permite la identificación de activadores de señalización de LIFR y BMPR candidatos, *por ejemplo*, agentes que atenían las propiedades de proliferación de las células madre y progenitoras. Los activadores de señalización de LIFR y BMPR candidatos se pueden ensayar luego en células diferenciadas o diferenciadas para determinar si el efecto de los agentes candidatos es específico de las células madre tumorales, más que ser generalmente citotóxicos.

Los activadores de señalización de LIFR y de BMPR también pueden incluir moléculas de interferencia del ARN (ARNi), ribozimas u oligonucleótidos antisentido. Estas moléculas pueden reducir la expresión de inhibidores de la señalización de LIFR y BMPR y así tienen el efecto de activar la señalización de LIFR y BMPR.

Los activadores de señalización de LIFR y de BMPR de la descripción son de utilidad para incrementar la señalización mediada por LIFR o BMPR en una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un método de incremento de la señalización mediada por LIFR o BMPR en una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral, método que comprende poner en contacto la célula madre tumoral o la célula progenitora tumoral con un activador de señalización de LIFR y/o BMPR durante un tiempo y en condiciones suficientes para incrementar la señalización mediada por LIFR o BMPR en la célula madre tumoral o la célula

progenitora tumoral. Los activadores de señalización de LIFR y/o BMPR también se pueden usar en combinación con una preparación de LIF y/o una preparación de BMP como se revela en la presente.

La descripción también proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno caracterizados por la proliferación celular excesiva o mal regulada. Los métodos implican la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de LIFR y/o activador de señalización de BMPR a un sujeto o tejido pensado como sometido a tal proliferación celular excesiva o mal regulada. Preferiblemente, el trastorno caracterizado por una excesiva proliferación celular es un trastorno cerebral, más preferiblemente, un tumor cerebral que incluye, pero sin limitación, neuroma acústico, adenoma, astrocitoma, astrocitoma pilocítico juvenil, glioma del tronco encefálico, cordoma, plexo coroide, craneofaringioma, ependimoma, ganglioglioma, ganglioglioneurocitoma, glioblastoma multiforme (GBM), glioma, linfoma, meduloblastoma, meningioma, oligodendroglioma, glioma del nervio óptico, un tumor de la pituitaria, un tumor pineal o pineoblastoma. Los activadores de señalización de LIFR y/o de BMPR también se pueden administrar en combinación (ya sea al mismo tiempo o en tempos diferentes) con una preparación de LIF y/o una preparación de BMP como se revela en la presente.

En otro aspecto la descripción proporciona un método para reducir el crecimiento de un tumor que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un activador de señalización de LIFR y/o un activador de señalización de BMPR a dicho tumor.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de reducción de la cantidad de células madre tumorales y/o células progenitoras tumorales en un tumor que comprende poner en contacto el tumor con un activador de señalización de LIFR y/o un activador de señalización de BMPR. Sin quedar ligados por la teoría o hipótesis, se cree que cuando se administra a un tumor, los activadores de la señalización de LIFR y los activadores de señalización de BMPR llevan a un incremento de la señalización mediada por LIF o por BMP, que da como resultado la modulación de cualquiera o más de las siguientes propiedades de las células madre tumorales o células progenitoras tumorales tales como, pero sin limitación, propiedades de supervivencia celular, autorrenovación, división simétrica, proliferación y/o diferenciación. En particular, se cree que el incremento de la señalización mediada por LIFR o BMPR da como resultado una reducción en las propiedades de proliferación de las células madre y progenitoras y en particular una reducción en la probabilidad de división simétrica exhibida por las células madre o células progenitoras proliferantes reduciendo así sus cantidades. Por consiguiente, en otro aspecto, la descripción proporciona métodos para reducir la probabilidad de que una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral se someta a división simétrica, método que comprende poner en contacto la célula madre tumoral o célula progenitora tumoral con un activador de señalización de BMPR y/o un activador de señalización de LIFR.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el activador de señalización de LIFR y/o de BMPR se puede administrar a un sujeto directamente de modo que las células madre tumorales y células progenitoras tumorales endógenas se regulen in vivo. En realizaciones alternativas de la presente descripción, las células madre tumorales y las células progenitoras tumorales se pueden poner en contacto con los agentes de la presente descripción in vitro.

Los métodos para administrar los activadores de la señalización de LIFR y/o los activadores de señalización de BMPR a un sujeto, incluyendo a un tumor, junto con composiciones farmacéuticas que comprenden activadores de la señalización de LIFR y/o activadores de señalización de BMPR, se proporcionan más abajo en la sección intitulada "Administración y composiciones farmacéuticas"

Administración y composiciones farmacéuticas

Como se divulgó con anterioridad, las composiciones terapéuticamente eficaces de una preparación de LIF y/o de una preparación de BMP y/o de un activador de la señalización de LIFR y/o de un activador de la señalización de BMPR pueden administrarse, entre otros, a un sujeto o tejido para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno caracterizado por una proliferación celular excesiva o mal regulada. Por ejemplo, en una realización se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de BMP-4 o de un mimético de BMP-4 a un paciente humano que sufre de GBM. Además de los tumores y cánceres descritos con anterioridad, otros cánceres que pueden ser tratados o prevenidos de acuerdo con los métodos divulgados en la presente incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (inclusive cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (que incluye cáncer gastrointestinal), cáncer de páncreas, cáncer de cerviz, cáncer de ovario, cáncer de hígado, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, melanoma, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, como también linfoma de células B (que incluye linfoma de bajo grado/folicular no Hodgkin (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL intermedio/NHL folicular; NHL intermedio de grado difuso; NHL inmunoblástico de elevado grado; NHL de células pequeñas no escindidas de elevado grado; NHL de enfermedad masiva; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom; leucemia linfocítica crónica (CLL, chronic lymphocytic leukemia); leucemia linfoblástica aguda (ALL; acute lymphoblastic leukemia), leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD, post-transplant lymphoproliferative disorder).

En una realización, se administra una preparación de LIF y/o una preparación de BMP y/o un activador de señalización de LIFR y/o un activador de señalización de BMPR a un sujeto en la forma de una composición farmacéutica. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que son útiles para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno caracterizados por una proliferación celular excesiva o mal regulada. Las composiciones farmacéuticas de la descripción comprenden por lo menos un agente seleccionado de entre el grupo consistente en una preparación de LIF, una preparación de BMP, un activador de la señalización de LIFR y/o un activador de la señalización de BMPR. Por ejemplo, en una realización una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de BMP-4 se proporciona para el tratamiento de GBM. En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de BMP-2 para el tratamiento de GBM. En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de BMP-5 para el tratamiento de GBM. En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de BMP-6 para el tratamiento de GBM. En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de BMP-7 para el tratamiento de GBM. En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de BMP-8b para el tratamiento de GBM.

En otro aspecto, la descripción divulga la utilización de una preparación de LIF y/o de una preparación de BMP y/o de un activador de la señalización de LIFR y/o de un activador de la señalización de BMPR en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno caracterizados por una proliferación celular excesiva o mal regulada. La invención proporciona una preparación de la proteína LIF para el tratamiento de glioblastoma multiforme.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden comprender un agente único o pueden comprender cualquier combinación de los agentes anteriormente mencionados, por ejemplo, una combinación de LIF y BMP-4. Por otra parte, las composiciones farmacéuticas pueden comprender más de un agente de una clase particular, por ejemplo, dos preparaciones LIF diferentes o dos activadores de señalización de BMPR diferentes, por ejemplo BMP-2 y BMP-4.

Las composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable. En tales composiciones farmacéuticas, una preparación de LIF y/o un activador de la señalización de LIFR y/o un activador de la señalización de BMPR forma el "compuesto activo". Como se utiliza en el presente, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con una administración farmacéutica. En las composiciones pueden incorporarse también compuestos suplementarios activos. Se formula una composición farmacéutica de manera que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vía de administración incluyen la vía parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea, pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyecciones, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico; metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico y bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede estar encerrada en ampollas jeringas descartables o en viales de múltiples dosis hechos de vidrio o de material plástico.

Obsérvese que en las realizaciones en las que un tejido o célula de los que se considera que experimentan una proliferación celular excesiva o mal regulada es tratado con una preparación de LIF y/o con una preparación de BMP y/o con un activador de la señalización de LIFR y/o de un activador de BMPR *in vitro*, una preparación de LIF y/o una preparación de BMP y/o activador de la señalización de LIFR y/o activador de la señalización de BMPR puede estar o no en la forma de una composición farmacéutica.

El término "sujeto" utilizado en la presente se refiere a seres humanos y a primates no humanos (por ejemplo, gorilas, macacos, tití), animales de ganado (por ejemplo, ovejas, vacas, caballos, burros, cerdos), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos), animales utilizados en ensayos de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayos, hámsteres), animales salvajes cautivos (por ejemplo, zorros, venados) o cualesquiera otros organismos que puedan beneficiarse de los agentes de la presente descripción. No hay ninguna limitación acerca del tipo de animal que podría beneficiarse de los agentes descritos en la presente. El sujeto más preferido de la presente descripción es un ser humano. Un sujeto, independientemente de si se trata de un ser humano o de un organismo no humano, recibe la denominación de paciente, Individuo, animal, huésped o receptor.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o de dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución fisiológica salina, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N. J.) o solución salina tamponado con fosfato (PBS, phosphate buffered saline). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida en la medida que sea fácil aplicarla mediante jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse

5
10
contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de ellos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido para las partículas en el caso de una dispersión y mediante la utilización de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianas y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede promoverse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

15
Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados con anterioridad, de acuerdo con necesidad, seguido de esterilización filtrada. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada filtrada de él.

20
25
Las composiciones orales por lo general incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración oral terapéutica, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, tabletas o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador líquido para usar como enjuague bucal. Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, tabletas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

30
Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

35
La administración sistémica también puede efectuarse por vía transmucosal o transdérmica. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera por penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

40
45
En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra su eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos específicos de células) también se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. No. 4.522.811.

50
Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosis unitaria", tal como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto por tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

55
60
La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los efectos terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los compuestos que exhiben elevados índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no

infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios efectuados en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo en función de la forma de dosis empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la descripción, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración de plasma circulante que incluye la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en el plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Como se define en la presente, una "cantidad terapéuticamente eficaz de proteína o polipéptido (es decir, una dosificación efectiva)" puede variar de aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, con preferencia, de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, con mayor preferencia, de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, e incluso más preferiblemente alrededor de 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg o de 5 a 6 mg/kg de peso corporal. La proteína o polipéptido se puede administrar una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. El experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y en el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, polipéptido o anticuerpo puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos.

En realizaciones de la descripción en las que se trata un trastorno proliferativo del cerebro, por ejemplo GBM, es preferible que la composición farmacéutica y/o el método de administración se adapten para superar la barrera hematoencefálica (BBB) y/o la barrera hematotumoral (BTB). Los métodos para administrar composiciones farmacéuticas a través de la BBB son conocidos en la técnica. Por ejemplo, ver Misra et al, (2003) J Pharm Pharm Sci 6: 252-273. Los métodos adecuados incluyen sin limitación métodos para la administración de fármacos cerebrales transcraneales tales como implantación intracerebral, infusión intracerebroventricular (ICV) y/o difusión potenciada por convección (CED). La implantación intracerebral puede realizarse usando, por ejemplo, perlas de polímero (tales como perlas acrílicas de heparina) o láminas de polímero (como polifeprosano 20) impregnadas con una preparación de LIF y/o de una preparación de BMP y/o activadores de señalización de LIFR y/o activadores de señalización de BMPR. Por ejemplo, la implantación intracerebral puede llevarse a cabo inyectando estereotácticamente perlas acrílicas de heparina cargadas con BMP-4 en el tumor o en la cavidad de la resección.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden las preparaciones BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 o BMP-8b (o combinaciones de las mismas), se pueden administrar a un tumor no reseccionado usando estos métodos; como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a la cavidad de la resección después de la resección del tumor. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran primero intratumoralmente, y luego se administran en forma posoperatoria después de la resección del tumor.

En algunas realizaciones, una preparación de LIF y/o una preparación de BMP y/o un activador de señalización LIFR y/o activador de señalización BMPR está asociada con una molécula que puede unirse a un epítipo exofacial en un componente del sistema de transporte mediado por receptor (RMT, receptor-mediated transport) de la barrera hematoencefálica (BBB). De esta forma, la preparación de LIF y/o una preparación de BMP y/o un activador de señalización de LIFR y/o activador de señalización de BMPR, pueden transportarse a través de la BBB usando el sistema de RMT endógeno. Por ejemplo, una preparación de LIF o de BMP puede conjugarse con un anticuerpo monoclonal (tal como OX26) al receptor de transferrina (TfR) para permitir el transporte transmembrana del conjugado. Véase, por ejemplo, Pardridge, *NeuroRx* 2 (1): 3-14 (2005). Las nanopartículas también pueden inducirse a cruzar la BBB por conjugación a, por ejemplo, OX26; dichas nanopartículas también pueden conjugarse con una preparación LIF y/o una preparación de BMP y/o un activador de señalización de LIFR y/o un activador de señalización de BMPR. Ver por ejemplo, Olivier et al., *Pharm Res.* (2002) 19 (8): 1137-43. Además, los liposomas conjugados a, por ejemplo, OX26 se pueden usar para administrar una preparación de LIF encapsulada y/o una preparación de BMP y/o un activador de señalización de LIFR y/o un activador de señalización de BMPR a través de la BBB. Ver Huwyler y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* (1996) 93 (24): 14164-9. Además, los agentes y tratamientos que interrumpen el BBB y el BTB también pueden usarse para hacer pasar una preparación de LIF y/o una preparación de BMP y/o un activador de señalización LIFR o un activador de señalización BMPR a través de BBB o BTB. Por ejemplo, la infusión intracarotídica del agente vasoactivo bradiquinina puede aumentar selectivamente la permeabilidad en los capilares de tumores cerebrales. Ver Matsukado et al., *Brain Res.* (1998) 792 (1): 10-5.

En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican las preparaciones de LIF y BMP, o los activadores de señalización de LIFR o BMPR de polipéptido y péptido, o para ribozimas, moléculas de ARNi y moléculas antisentido que son activadores de señalización LIFR o BMP, se insertan en vectores y se utilizados como vectores de terapia

genética. Los vectores de terapia genética pueden administrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (ver la Patente de Estados Unidos No. 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (ver, por ejemplo, Chen y otros (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91: 3054 - 3057; Voges y otros (2003), Ann. Neurol., 54: 479 - 487). La preparación farmacéutica del vector de terapia genética puede incluir el vector de terapia genética en un diluyente o encapsulante aceptable (tal como un liposoma que contiene el vector), o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está incrustado el portador de administración de genes. Como alternativa, cuando el vector de suministro genético completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro de genes. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican las preparaciones de LIF y BMP, o para los activadores de señalización de LIFR o BMPR de polipéptido y péptido, se transfieren a células madre de cáncer neural de mamífero mediante vectores lentivirales, como se describe en Consiglio et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2004, 12 de octubre; 101 (41): 14835-14840.

En algunas realizaciones, se administra un único compuesto activo de acuerdo con la descripción, por ejemplo, una única preparación de LIF o una única preparación de BMP. En otras realizaciones, múltiples compuestos activos se administran conjuntamente, por ejemplo, dos diferentes preparaciones de LIF; o una preparación de LIF y una preparación de BMP; o un activador de señalización de BMPR y dos preparaciones de BMP diferentes. Además, los compuestos activos de la descripción se pueden coadministrar con otros productos farmacéuticos, tales como agentes quimioterapéuticos, sensibilizadores a la radiación, agentes radioterapéuticos, y similares. Cualquier referencia en la presente a "coadministrado" significa una administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes a través de la misma ruta o por rutas diferentes o la administración secuencial por la misma ruta o por rutas diferentes. La referencia en este documento a la administración "secuencial" se refiere a un tiempo diferencia de segundos, minutos, horas o días entre la administración de los dos tipos de agentes y/o composiciones farmacéuticas. La coadministración de los agentes y/o composiciones farmacéuticas puede ocurrir en cualquier orden.

Los métodos de tratamiento y las composiciones farmacéuticas descritos en la presente pueden usarse junto con otros tratamientos, incluidos los tratamientos de quimioterapia (como carmustina, cisplatino, paclitaxol, temozolomida, PCV (procarbazona, lomustina y vincristina) e IL13-PE38QQQR) con radioterapia (tal como anticuerpos radiomarcados o ligandos de ácido nucleico radiomarcados), radioterapia y cirugía (incluida resección tumoral / eliminación quirúrgica de la masa). Por ejemplo, las preparaciones de BMP-4 pueden coadministrarse con agentes quimioterapéuticos después de la cirugía de resección tumoral y la radioterapia para el tratamiento de GBM. Estos tratamientos adicionales se pueden usar antes y/o durante y/o después del tratamiento de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

Ejemplos

La presente descripción se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Cabe señalar que para los Ejemplos 19-23, los protocolos utilizados para obtener los resultados enumerados se proporcionan en los Ejemplos 24-29. Los ejemplos 4, 10, 11 y 13 son ejemplos de la presente invención.

Ejemplo 1: Pasaje seriado de células madre neurales humanas fetales y análisis de la frecuencia de células madre y progenitoras sobre la base del modelado matemático

Se derivó un algoritmo para calcular el número de células madre neurales y el número de células progenitoras neurales presentes en cultivos de neuroesferas pasados en serie. A los efectos de este algoritmo, todas las celdas se dividen en tres categorías:

1. Las células madre se definen como: células indiferenciadas capaces de, (a) proliferación, (b) autorrenovación durante un período de tiempo extendido, (c) capaces de generar un gran número de progenie, y (d) la capacidad de generar todos los tipos de células del tejido del que se obtiene,
2. Las células progenitoras se definen como: células indiferenciadas capaces de, (a) proliferación, (b) capacidad de autorrenovación limitada, (c) generación de un número limitado de progenie y (d) la capacidad de originar al menos un tipo de progenie; y
3. Las células diferenciadas se definen como una célula con capacidad de proliferación limitada o nula y expresión de marcadores específicos de linaje y propiedades funcionales maduras.

Los términos "células madre" y NSC se pueden usar en forma indistinta en la presente.

De modo similar, los términos "célula progenitora" y NPC también se puede usar de modo indistinto en la presente.

En la descripción de este algoritmo, se han realizado una serie de suposiciones:

1. Una neuroesfera está compuesta de células madre, células progenitoras y células diferenciadas.
2. Cada neuroesfera crece a partir de una célula madre única o célula progenitora única.
3. Una célula madre tiene una vida infinita y una célula progenitora tiene una vida finita. La vida finita se define

como / pasajes.

4. Una célula madre siempre forma una neuroesfera y una célula progenitora formará una neuroesfera a menos que haya llegado al final de su ciclo de vida.

5. Cada neuroesfera tiene un total de células c que son de una de dos posibles composiciones. Las posibles composiciones son:

a. en cada neuroesfera derivada de una célula madre única, la composición es células madre c , células progenitoras p y el resto son células diferenciadas; y

b. en cada neuroesfera derivada de una célula progenitora única, la composición es células progenitoras p , el resto es células diferenciadas.

10. Se ha derivado un algoritmo que describe el número total de células, T_n , en cada pasaje, n . Al comienzo del experimento, se disocia una neuroesfera derivada de células madre, es decir, hay células madre s , células progenitoras p y células diferenciadas $c-s-p$. Las células madre y progenitoras se dejan crecer en neuroesferas de las cuales el número total es $s+p$ y las células diferenciadas mueren. El número total de células en el momento del primer pasaje T_1 , está dado por el producto del número total de neuroesferas con el número de células en cada neuroesfera:

15

$$(1) \quad T_1 = (s + p)c = sc + pc$$

La segunda igualdad de la ecuación anterior es interesante porque $s c$ representa el número total de células en neuroesferas derivadas de células madre y $p c$ representa el número total de células en neuroesferas derivadas de células progenitoras.

20. Asumiendo que las células progenitoras vivan durante dos generaciones, en la actualidad estas neuroesferas están disociadas. En el primer pasaje hay neuroesferas derivadas de células madre s , cada una de las cuales debe contener células madre s , células progenitoras p y células diferenciadas $c-s-p$. También en el primer pasaje están las neuroesferas derivadas de del progenitor p cada una de las cuales a su vez contiene células progenitoras p y células diferenciadas $c-p$. Estas células recién disociadas crecerán en sus propias neuroesferas, excepto las células diferenciadas que mueren. El número total de células en el momento del segundo pasaje, T_2 , entonces está dado por:

(2)
$$T_1 = sc + pc$$

25

$$(3) \quad T_2 = (s + p)sc + (p)ps = s^2c + spc + p^2c$$

La primera columna en el lado derecho de la igualdad contiene los términos que representan las neuroesferas derivadas de células madre. La segunda columna representa las neuroesferas derivadas del progenitor.

30. La segunda igualdad en la ecuación T_2 representa el número total de células en una forma expandida. Los términos s^2c denotan el número total de células en la neuroesfera derivada de células madre que en la próxima generación se convertirán en neuroesferas derivadas de células madre. El segundo término, spc , representa el número total de células en las neuroesferas derivadas de células madre que en la próxima generación se convierten en neuroesferas derivadas de células progenitoras. El último término, p^2c , representa las neuroesferas derivadas de células progenitoras que, de acuerdo con su vida, se convertirán en neuroesferas derivadas de células progenitoras o morirán.

35. Estas células ahora pasan y llevan a la tercera generación. El número total de células en esta generación depende de la vida de las células progenitoras. Si la vida es solo de dos generaciones, entonces las células progenitoras derivadas del progenitor ahora morirán en lugar de crear una nueva neuroesfera. Bajo esta suposición, el número total de células en el momento del tercer pasaje, T_3 está dado por:

(4)
$$T_1 = sc + pc$$

(5)
$$T_2 = s^2c + spc + p^2c$$

(6)
$$T_3 = (s + p)s^2c + (p)psc + 0 = s^3c + s^2pc + p^2sc$$

40. De forma similar, se puede determinar el número total de células en el momento del cuarto pasaje. La reescritura de estas ecuaciones produce:

$$(7) \quad T_1 = cs \left(1 + \frac{p}{s} \right)$$

$$(8) \quad T_2 = cs^2 \left(1 + \frac{p}{s} + \left(\frac{p}{s} \right)^2 \right)$$

$$(9) \quad T_3 = cs^3 \left(1 + \frac{p}{s} + \left(\frac{p}{s} \right)^2 \right)$$

$$(10) \quad T_4 = cs^4 \left(1 + \frac{p}{s} + \left(\frac{p}{s} \right)^2 \right)$$

En consecuencia, por inducción, se puede decir que en el n^{th} pasaje el número total de células estará dado por

$$(11) \quad T_n = cs^n \left(1 + \frac{p}{s} + \left(\frac{p}{s} \right)^2 \right) \quad \text{donde } n \geq 2.$$

Se debe repetir que esta ecuación se basa en la suposición de que la vida del progenitor es de dos generaciones.

- 5 Si la vida de las células progenitoras es superior a dos generaciones, el número total de células en el momento del tercer pasaje, T_3 está dado por

$$(12) \quad T_1 = sc + pc$$

$$(13) \quad T_2 = s^2c + spc + p^2c$$

$$(14) \quad T_3 = (s+p)s^2c + (p)psc + (p)p^2c = s^3c + s^2pc + p^2sc + p^3c$$

Si la vida del progenitor es de tres generaciones, entonces el número total de células en la cuarta generación está dado por:

$$(15) \quad T_1 = cs \left(1 + \frac{p}{s} \right)$$

$$(16) \quad T_2 = cs^2 \left(1 + \frac{p}{s} + \left(\frac{p}{s} \right)^2 \right)$$

$$(17) \quad T_3 = cs^3 \left(1 + \frac{p}{s} + \left(\frac{p}{s} \right)^2 + \left(\frac{p}{s} \right)^3 \right)$$

$$(18) \quad T_4 = cs^4 \left(1 + \frac{p}{s} + \left(\frac{p}{s} \right)^2 + \left(\frac{p}{s} \right)^3 \right)$$

Por lo tanto, con esta suposición específica, por inducción, se puede decir que el número total de células en el n^{th} paso está dado por

$$(19) \quad T_n = cs^n \left(1 + \frac{p}{s} + \left(\frac{p}{s} \right)^2 + \left(\frac{p}{s} \right)^3 \right) \quad \text{donde } n \geq 3$$

5 En general, mediante un argumento similar se puede demostrar que si la vida de la célula progenitora es de l generaciones, entonces el número total de células en el n^{th} pasaje está dado por

$$(20) \quad T_n = cs^n \sum_{i=0}^n \left(\frac{p}{s} \right)^i \quad \text{donde } n < l$$

$$(21) \quad T_n = cs^n \sum_{i=0}^l \left(\frac{p}{s} \right)^i \quad \text{donde } n \geq l$$

Existe una simplificación bien conocida para la suma en la ecuación anterior,

$$(22) \quad \sum_{i=0}^l r^i = \frac{1 - r^{l+1}}{1 - r}$$

10

En consecuencia la expresión T_n simplifica:

$$(23) \quad T_n = cs^n \left[\frac{1 - \left(\frac{p}{s} \right)^{n+1}}{1 - \frac{p}{s}} \right] \quad \text{donde } n < l$$

$$(24) \quad T_n = cs^n \left[\frac{1 - \left(\frac{p}{s} \right)^{l+1}}{1 - \frac{p}{s}} \right] \quad \text{donde } n \geq l.$$

Debido a que, para un tipo de célula, p , s , c y l son fijos, se puede reemplazar el término entre corchetes por una

constante, por lo tanto:

$$(25) \quad T_n = B_1 s^n \quad \text{donde } n \geq l$$

y

$$(26) \quad B_1 = c \left[\frac{1 - \left(\frac{p}{s}\right)^{l+1}}{1 - \frac{p}{s}} \right]$$

5 Esta ecuación se puede representar en una forma lineal tomando el logaritmo de Ecuación (25) para obtener

$$(27) \quad \log T_n = n \log s + \log B \quad \text{donde } n \geq l.$$

10 Examinando la ecuación (27), la pendiente de esta línea recta es $\log s$ y la intersección y-es $\log B$. Desde un punto de vista experimental, esto significa que si el log del número total de células se grafica contra el número de pasaje, entonces el número de células madre en una neuroesfera se puede calcular mediante el examen de la pendiente del gráfico y el número de células progenitoras se puede calcular mediante el examen de la intersección con el eje y. Al construir esta gráfico, se debe tener cuidado de incluir solo los puntos de datos que están en números de pasajes mayores que la vida de las células progenitoras. La vida de las células progenitoras se calcula al observar que para

$l \geq n$, la relación del número total de células en el pasaje dado $\left(\frac{T_{n+1}}{T_n} = s\right)$, pero que para $l < n$ esta relación no es constante.

15 En consecuencia: $l = n + 1$, donde n es el número entero para el cual esta relación no es igual a s. Esta técnica se puede adaptar para manejar los datos ruidosos.

Es importante destacar que los primeros $l-1$ pasajes, $(1, \log T_1), \dots, (l-1, \log T_{l-1})$, no se hallan en la línea recta. Esto se puede ver al examinar las ecuaciones (23) y (24).

20 De la ecuación (27) se puede ver que el número de células progenitoras en una neuroesfera, p no afecta la pendiente de la línea. Si la pendiente cambia, esto debe significar que la cantidad de células madre cambia. Si la pendiente es 0, es decir, si la línea es horizontal, entonces solo hay una célula madre en una neuroesfera y, por lo tanto, el número total de células en cada pasaje no se expande.

25 Si las condiciones bajo las cuales crecen las neuroesferas cambian, por ejemplo, si el factor de crecimiento cambia de solo EGF a solo EGF + FGF, entonces la pendiente de la línea todavía está determinada únicamente por el número de células madre en una neuroesfera. La prueba de esta afirmación constituye el resto de esta sección.

Se supone que las condiciones cambian después del r^{th} pasaje y el número de células madre que se producen cambia a q , el número de células progenitoras a w y la vida de las células progenitoras a m generaciones (por conveniencia asumiremos que $m \leq l$ pero el caso donde $m > l$ es similar). El número total de células después de los pasajes $R + L$ está dado por:

$$(28) \quad T_{r+1} = (q+w)s^r c + w \sum_{i=1}^{m-1} \left(\frac{p}{s}\right)^i \quad \text{donde } m \leq l$$

Después de $r + m - 1$ pasajes el número total es

$$(29) \quad T_{r+m-1} = c s^r q^{m-1} \sum_{i=0}^{m-1} \left(\frac{w}{q}\right)^i + w^{m-1} \left(\frac{p}{s}\right)$$

Y después de $r + m$ pasajes el número total es:

$$(30) \quad T_{r+m} = cs^r q^m \sum_{i=0}^m \left(\frac{w}{q}\right)^i$$

Por inducción, el número total de células después de $r + N$ pasajes entonces es:

$$(31) \quad T_{r+N} = q^N s^r c \sum_{i=0}^m \left(\frac{w}{q}\right)^i$$

$$(32) \quad = B_r q^N$$

5 donde:

$$(33) \quad B_r = s^r c \sum_{i=0}^m \left(\frac{w}{q}\right)^i$$

Linealización,

$$(34) \quad \log T_N = N \log q + \log B_r$$

10 Por lo tanto, como antes, se puede ver que después del cambio de condiciones, la pendiente de esta línea solo es afectada por el número de células madre.

Sobre la base del algoritmo anterior, la frecuencia de células madre y células progenitoras se puede calcular a partir de las siguientes etapas:

1. pasar las células en forma seriada en el ensayo de la neuroesfera y graficar el número total de células generadas en cada pasaje en función de multiplicar las células totales de la
- 15 2. linealizar la curva de crecimiento logarítmico tomando el logaritmo de las células totales generadas en cada pasaje;
3. calcular la línea de mejor ajuste y luego usar la fórmula para una línea recta ($y = mx + b$) para calcular la pendiente de la línea y la intersección en y, que a su vez revela el número de células madre y el número de células progenitoras usando las fórmulas anteriores.

20 **Ejemplo 2: Pasaje seriado de células madre neurales humanas fetales y análisis de la frecuencia de células madre y progenitoras sobre la base del modelado matemático**

El modelo matemático del Ejemplo 1 se aplicó a las células madre neurales humanas fetales pasadas en serie. Las células madre neurales humanas fetales se pasaron en forma seriada usando técnicas convencionales (es decir, las células se sembraron en una densidad clonal en cada pasaje usando una fracción de las células del pasaje anterior, y usando el medio libre de suero suplementado con los mitógenos EGF y FGF2), como se describe en Vescovi et al. (1999) Exp. Neurol. 156: 71-83. Al final de cada pasaje, se determinó el número total de células mediante la disociación de las células en una suspensión celular única y recuento de las células de suspensión celular única y recuento del número de células viables y muertas por células de exclusión con azul de tripano. El número teórico total de células al final de cada pasaje (que es una función del número total de células contadas al final del pasaje y la fracción del pasaje inmediatamente anterior que se sembró de nuevo para producir las células contadas) se graficó versus número de pasaje (FIGURA 1A) para producir una curva de crecimiento. El log del número total de células al final de cada pasaje también se graficó versus al número de pasaje (FIGURA 1B). Se generó una línea de tendencia de mejor ajuste para el gráfico log lineal (FIGURA 1B) y se usó la fórmula para una línea recta ($y = mx + b$) para determinar la pendiente y la intersección en y. La frecuencia de células madre y células progenitoras se calculó de acuerdo con las ecuaciones (26) y (27) en el Ejemplo 1 (con $n = 1$, $l = n + 1 = 2$, $c = 1000$; estos valores también se usan en todos los siguientes ejemplos). Se calculó que la frecuencia de células madre era del 0,24% de la población celular total, y se calculó que la frecuencia de células progenitoras era del 1,15% de la población celular total.

Ejemplo 3: Análisis de la frecuencia de células madre y progenitoras de células madre neurales humanas fetales en el ensayo de células formadoras de colonia neurales

El ensayo de células formadoras de colonias neurales (NCFCA) se puede utilizar para determinar la frecuencia de células madre y progenitoras sobre la base de un análisis del tamaño de la colonia neural. El NCFCA se describe en la publicación de solicitud de la patente de Estados Unidos serie No. 2005/0112546, publicada el 26 de mayo de 2005. En resumen, el NCFCA se realiza mediante la suspensión de células neurales en un medio semisólido, preferiblemente un medio semisólido a base de colágeno o a base de metilcelulosa (IMDM, DMEM/F12, McKoy's, Iscoves). El medio semisólido puede comprender el mismo medio adecuado usado para cultivar las células neurales (por ejemplo, Neurocult™ [StemCell Technologies, Inc.] medio libre de suero sin citoquinas más Neurocult™ Proliferation Supplements más EGF) al que se añade colágeno o metilcelulosa. El medio está preferiblemente libre de suero. Las células en el medio semisólido se siembran a una concentración que permitirá un número suficiente de colonias para análisis estadísticos de los datos (por ejemplo, 1.000-25.000 células, preferiblemente 2.500-7.500 por placa de cultivo de 35 mm). Las colonias que se forman surgen de una célula única, ya sea una célula madre o una célula progenitora neural.

Las colonias se cultivan hasta el tamaño adecuado y se pueden distinguir las diferencias entre tamaños de colonias (por ejemplo, aproximadamente 10-30 días), luego se cuentan las colonias y se estima el tamaño de las colonias usando rejillas en una placa de clasificación. Las colonias que se generaron a partir de una célula madre neural única continuarán creciendo en tamaño con el tiempo, mientras que las colonias generadas a partir de una célula progenitora neural tendrán una capacidad limitada para crecer y por lo tanto no continuarán creciendo en tamaño con el tiempo. El tamaño de la colonia distinguirá entre NSC de potencial proliferativo alto (HPP-NSC), NSC de potencial proliferativo bajo (LPP-NSC) y las células progenitoras neurales. Por lo tanto, el tamaño de la colonia generada puede ser indicativo de si la colonia se generó a partir de una célula madre neural o una célula progenitora neural y además si NSC tiene un potencial proliferativo alto o bajo. En particular, las colonias más grandes (en comparación con las otras colonias en la placa) son indicativas de células madre neurales de alto potencial proliferativo, las colonias de tamaño medio son indicativas de células progenitoras neurales de bajo potencial proliferativo, y las colonias más pequeñas son indicativas de células progenitoras neurales. El diámetro real de las "colonias más grandes" o "colonias más pequeñas" dependerá de muchos factores, tales como cuánto tiempo se cultivan las colonias, etc. Por ejemplo, después de cultivar 2.500 células/placa durante 14-28 días, las colonias se clasificaron en una de cuatro categorías basadas en el diámetro: (1) > 2,0 mm, (2) 1-2 mm, (3) 0,5-1 mm y (4) <0,5 mm. Por lo tanto, asumiendo que las colonias se cultivan durante al menos 14 días, un diámetro mayor de 2,0 mm es indicativo de una colonia generada a partir de una célula madre neural. Los tipos de células en el NCFCA también se pueden distinguir en función de las morfologías que producen. Las colonias onduladas son producidas por células madre neurales, mientras que las colonias con una periferia lisa son producidas por células progenitoras neurales. Los kits para realizar el NCFCA están disponibles comercialmente en StemCell Technologies, Inc.

La frecuencia de células madre y progenitoras para células madre neurales humanas fetales se calculó mediante la siembra de células en el NCFCA. La progenie de células madre neurales fetales del pasaje 12 se disoció en una suspensión de células únicas y se sembró a una densidad de 2000 células/ml junto con 20 ng/ml de EGF y 10 ng/ml de bFGF. Las células se cultivaron en el medio semisólido durante 3 semanas después de lo cual se calcularon la frecuencia y el tamaño de las colonias. Menos del 2% del total de células sembradas formaron colonias que exhiben características de células madre. Por lo tanto, los resultados del Ejemplo 2 del método de análisis matemático son compatibles con los resultados del NCFCA.

Ejemplo 4: El factor inhibidor de leucemia (LIF) reduce la frecuencia de células madre y progenitoras en células madre neurales humanas fetales pasadas en serie

Las células madre neurales humanas fetales pasadas en serie se cultivaron en condiciones de proliferación normal como en el Ejemplo 2 (que incluye los mitógenos FGF2 y EGF) con o sin la adición de 20 ng/ml de LIF humano. Se generaron curvas de crecimiento para ambos grupos (FIGURA 2A), se convirtieron a una escala lineal tomando el log del número teórico total de células generadas al final de cada pasaje (ver el Ejemplo 2) y se determinaron la pendiente y la intersección sobre la base de la línea de tendencia de mejor ajuste (FIGURA 2B). El análisis de la frecuencia de células madre y progenitoras de acuerdo con el método del Ejemplo 1 reveló una reducción del 48% en la frecuencia de células madre y una reducción del 18% en la frecuencia de células progenitoras en presencia de LIF (FIGURA 2C; el eje y representa el % del valor de control). Por lo tanto, LIF se puede usar para reducir la frecuencia de células madre neurales y células progenitoras neurales en células madre neurales humanas pasadas en serie.

Ejemplo 5: La proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) reduce la frecuencia de células madre y progenitoras en células madre neurales humanas fetales pasadas en serie

Las células madre neurales humanas fetales pasadas en serie se cultivaron en condiciones de proliferación normal (que incluye los mitógenos FGF2 y EGF) como en el Ejemplo 2 con o sin la adición de 20 ng/ml de la proteína BMP-2 humana. Se generaron curvas de crecimiento para ambos grupos, se convirtieron a una escala lineal tomando el log del número teórico total de células generadas al final de cada pasaje y se determinaron la pendiente y la intersección sobre la base de la línea de tendencia de mejor ajuste. El análisis de la frecuencia de células madre y progenitoras de acuerdo con el método del Ejemplo 1 reveló una reducción en ambos tipos celulares en presencia de BMP-2. Por lo

tanto, la BMP se puede usar para reducir la frecuencia de células madre neurales y células progenitoras neurales en células madre neurales humanas pasadas en serie.

Ejemplo 6: Las células pasadas en serie derivadas del glioblastoma multiforme (GBM) exhiben rasgos clave de células madre

5 El GBM humano contiene células madre neurales tumorales (tNSC) que proliferan en condiciones adaptadas para permitir el crecimiento ex vivo de células madre neurales. Ver Galli et al. (2004) Cancer Research 64: 7011-7021. Las tNSC se pueden aislar a partir de muestras tumorales de acuerdo con el método de Galli et al (2004), supra, y Vescovi et al., Exp. Neurol. 156: 71-83 (1999). Brevemente, las tNSC se pueden aislar disociando primero las muestras tumorales mediante trituración en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/F12 que contiene 07 mg/ml de ovomucoide. Las células se recogen por centrifugación y se resuspenden en medio NS-A químicamente definido libre de factor de crecimiento (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) que contiene glutamina 2 mM, glucosa 0,6%, putrescina 9,6 gm/ml, progesterona 6,3 ng/ml, selenito de sodio 5,2 ng/ml, insulina 0,025 mg/ml, transferrina 0.1 mg/ml. Las células viables se siembran en matraces de cultivo de tejidos de 25 cm² a densidad (2.500-5.000 células/cm²) en el mismo medio NS-A definido químicamente más EGF 20 ng/ml y FGF2 20 ng/ml. El medio se reemplaza con medio fresco cada 24-48 horas si es necesario. 5 a 20 días después de la siembra, se pueden observar neuroesferas de células tumorales (ver la FIGURA 3A, que representa una vista de contraste de fase 20X) que se asemejan a las neuroesferas clásicas formadas in vitro por células madre neurales normales, como se describe en Reynolds and Weiss (1992) Science 255:1707-1710. Las neuroesferas de células tumorales se pueden disociar y volver a pasarse en serie en las mismas condiciones, con lo que las tNSC establecen nuevas neuroesferas de células tumorales. Las tNSC se autorrenuevan de forma estable y se expanden en cultivo (ver la FIGURA 3B que representa el número total teórico de células en cada división para dos líneas celulares GBM diferentes). Las tNSC son multipotenciales in vitro ya que su progenie produce neuronas, oligodendrocitos y astrocitos en condiciones de diferenciación. Por ejemplo, se observó tinción de progenie diferenciada con un anticuerpo anti-beta-tubulina, un anticuerpo anti-proteína ácido-fibrilar glial (GFAP) (GFAP es un marcador de diferenciación astrogliar) y con un anticuerpo anti-galactocerebrósido (GalC) (GalC es un marcador para oligodendrocitos).

10 Cuando se trasplantan a los cerebros de ratones inmunodeficientes, los tNSC generan GBM con inmunorreactividad para marcadores específicos de astrogliar, al igual que en GBM humanos típicos. Cuando estos tumores se extirpan y las tNSC se cultivan de nuevo, las tNSC secundarias regeneran GBM cuando se trasplantan en el cerebro de ratones inmunodeficientes. Por lo tanto, las tNSC humanas son unipotenciales in vivo, multipotenciales in vitro, pueden actuar como células fundadoras de tumores hasta el nivel clonal, y pueden establecer tumores en ratones que se parecen mucho a las características clave de la enfermedad humana incluso después del trasplante en serie. Por lo tanto, las tNSC humanas parecen estar implicados en el crecimiento y la recurrencia de la GBM humana

Ejemplo 7: Uso del modelado matemático de células tumorales pasadas en serie para calcular la frecuencia de células madre tumorales y células progenitoras tumorales.

35 Se determinó la frecuencia de células madre y progenitoras para tres líneas celulares GBM usando el método de análisis del Ejemplo 1. Las líneas celulares se derivaron de los tumores de tres pacientes diferentes (tumores obtenidos del Instituto Neurológico C. Besta y clasificados de acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud). (OMS)). Las células tumorales se pasaron en serie usando los métodos del Ejemplo 6, y el número total teórico de células generadas se graficó para cada pasaje para cada línea celular (627, 913, 1022) (ver la FIGURA 4A). Se calculó el log del número teórico total de células generadas al final de cada pasaje y, sobre la base de una línea de tendencia de mejor ajuste, se calcularon la pendiente y la intersección en y (ver la FIGURA 4B). La frecuencia del número de células madre y progenitoras se calculó utilizando el método del Ejemplo 1. La frecuencia de células madre tumorales fue 0,44% de las células totales, y la frecuencia de células progenitoras tumorales fue 1,56% de las células totales (representada para cada una de las tres líneas celulares de GBM en la FIGURA 4C).

Ejemplo 8: Cálculo de la frecuencia de células madre tumorales y células progenitoras tumorales de la progenie derivada de células madre tumorales de GBM en el ensayo de células formadoras de colonia neurales (NCFCA)

50 Las células de GBM del pasaje 15 se sembraron en el ensayo de células formadoras de colonias neurales (NCFCA) como se describe en el ejemplo 3. Los cultivos se alimentaron semanalmente con medios frescos y después de 3 semanas se determinó el diámetro de la colonia. En este ensayo, solo las colonias más grandes presentan características de células madre después de la extracción del medio semisólido y la subclonación. Entre 0,25% a 0,65% del total de las células sembrada formaron colonias grandes. Se debe ver el gráfico principal en la FIGURA 5 que muestra el % de celdas totales sembradas (eje y) que forman colonias en los siguientes rangos de tamaño de diámetro: 1.500-2.000 µm; 1.000-1.500 µm, 500-1.000 µm; y < 500 µm). El recuadro del gráfico principal de la FIGURA 5 muestra el % de celdas totales sembradas (eje y) que forman colonias en las categorías de 1.500—2.000 µm y de 1.000-1.500 µm de diámetro, utilizando una escala de eje y diferente a la del gráfico principal. Por lo tanto, el NCFCA y el análisis matemático del Ejemplo 7 producen una frecuencia similar para las células madre tumorales en las líneas celulares tumorales de GBM.

Ejemplo 9: Presencia de todas las formas de receptores de BMP en muestras tumorales primarias y tNSC.

La expresión de los tres receptores de BMP (BMPR1a, BMPR1b y BMPR2) se determinó en OCR en tiempo real en:

1. Muestras de tumores cerebrales humanos primarios: astrocitoma anaplásico (AA 031217); glioblastoma (GBM050203, GBM 040114, GBM 040202, GBM 050207, GBM 050208); y neoplasia neuroepitelial disembrionaria (NND 040115);
2. Células madre neurales fetales humanas normales (fNSCs); y
3. Líneas de células madre neurales tumorales de glioblastoma humano (tNSC) (GBM 010627, GBM 020913, GBM 021022) preparadas de acuerdo con el método del Ejemplo 6.

Se usó el siguiente método. Primero, se aisló el ARN total de las fNSC, tNSC y de las muestras de tumores primarios usando el reactivo TRIzol (Life Technologies, Rockville, MD), y luego se transcribió de forma inversa usando Superscript RNase H-Transcriptasa Reversa (Life Technologies, Rockville, MD). Todos los ADNs usados como moldes se normalizaron previamente usando Glicerolaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como un gen constitutivo y una línea celular MCF-7 como control positivo. Las reacciones cuantitativas de PCR en tiempo real se corrieron luego por triplicado usando cebadores específicos para cada receptor de BMP y usando el kit de reactivo principal QPCR verde Brilliant® SYBR® (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA). El colorante SYBR verde se une a cualquier producto de PCR, y por lo tanto no requiere el uso de sondas específicas de secuencia. Las mezclas maestras Brilliant SYBR verde contienen dUTP para usar con el protocolo de descontaminación UNG. Las secuencias de cebador utilizadas son las siguientes:

Secuencias del cebador x PCR transcripta inversa (RT)

hBMPR-1A Fw: 5'-AATGGAGTAACCTTAGCACACCAGAG-3'

hBMPR-1A Rv: 5'-AGCTGAGTCCAGGAACCTGTAC-3'

hBMPR-1B Fw: 5'-GGTTGCCTGTGGTCACTTCTGG-3'

hBMPR-1B Rv: 5'-TAGTCTGTGATTAGGTACAACCTGG-3'

hBMPR-2 Fw: 5'-TCAGATATATGGCACCCAGAAGTG-3'

Secuencias del cebador x PCR tiempo real

hBMPR1a Fw: 5'-caggttcctggactcagctc-3'

hBMPR1a Rv: 5'-cttccttgggtgccataaa-3'

hBMPR1b Fw: 5'-aaaggtcgctatggggaagt-3'

hBMPR1b Rv: 5'-gcagcaatgaaacccaaaat-3'

hBMPR2 Fw: 5'-gctaaaattggcagcaagc-3'

hBMPR2 Rv: 5'-ctgggccctatgtgctact-3'

La emisión fluorescente se registró en tiempo real (Detector de PCR en tiempo real de cuatro colores Cromo 4, MJ Research, BIO-RAD, USA). El perfil de expresión génica se completó usando el método Ct comparativo de cuantificación relativa (Higuchi et al). Para cada gen, las cantidades relativas de ARN se normalizaron para dos controles endógenos, GAPDH y ARNr 18s. Cada replicado se normalizó y la cantidad relativa promedio (RQ) se informa para cada gen. Los niveles de cambio medios se calcularon junto con la desviación estándar y los intervalos de confianza del 95% de los tres replicados.

La FIGURA 6 representa los resultados. Los resultados indican que diferentes tumores que tiene diferentes grados de agresividad tienen perfiles de expresión de BMPR característicos. Por lo tanto, el perfil de expresión de BMPR de un tumor se puede usar en un método de diagnóstico para caracterizar el tumor y predecir la agresividad del tumor.

Ejemplo 10: El factor inhibidor de leucemia (LIF) y las BMP reducen la frecuencia de células madre en líneas celulares de GBM humanas pasadas en serie

Las células tumorales GBM obtenidas de tres pacientes diferentes se pasaron en serie en medio de control (que incluye los mitógenos EGF + FGF2, ver el Ejemplo 6) con o sin LIF (20 ng/ml) o BMP-4 (20 ng/ml). El análisis de la frecuencia de células madre y progenitoras usando el método del Ejemplo 1 reveló una reducción significativa en el número de células madre tumorales mediante la adición de LIF o BMP-4 (una significancia estadística de $p < 0,01$), una reducción significativa en el número de células progenitoras tumorales mediante la adición de BMP-4 (a significación estadística de $p < 0,05$) pero ningún cambio significativo en la frecuencia de la población de células progenitoras tumorales mediante la adición de LIF. Estos resultados indican que las moléculas de BMP reducen la proliferación de células madre tumorales y progenitoras tumorales mientras que LIF reduce selectivamente el número de células madre tumorales sin efecto sobre la población progenitora tumoral. La Figura 7 representa gráficamente los resultados (como % de valores de control no tratados). Estos resultados indican que tanto LIF como BMP son efectivos para reducir la proliferación de tNSC, incluso en presencia de los mitógenos EGF y FGF2. Esto muestra que el tratamiento con LIF y/o BMP será efectivo en el tratamiento de tumores cerebrales en seres humanos.

Ejemplo 11: Aplicación de LIF y BMP-2 a células derivadas de GBM pasadas en serie reducen la frecuencia de células madre y progenitoras

Las células GBM pasadas en serie (ver el Ejemplo 6) en medio de control (que incluye los mitógenos EGF + FGF2, ver el Ejemplo 6) se trataron con LIF, BMP-2 o una combinación de BMP-2 + LIF. Las células GBM control pasadas en serie no se trataron con ninguna proteína. Las curvas de crecimiento se compararon usando el método del Ejemplo 1 para calcular la frecuencia de células madre y células progenitoras. Los datos revelan una mayor reducción en la frecuencia de las células madre tumorales y de las células progenitoras tumorales cuando se usan LIF y BMP-2 juntos que cuando se usan solos. La Figura 8 representa gráficamente los resultados (el eje y representa el % del valor de control no tratado). Estos resultados muestran que la coadministración de LIF y BMP-2 es efectiva para reducir la proliferación de las tNSC, incluso en presencia de los mitógenos EGF y FGF2, y que la coadministración de LIF y BMP-2 será efectiva en el tratamiento de tumores cerebrales en seres humanos.

Ejemplo 12: Tratamiento transitorio de células de GBM cultivadas con BMP-2 reduce permanentemente la frecuencia de células madre y progenitoras

Las células tumorales GBM obtenidas de tres pacientes diferentes se pasaron en serie en medio de control (que incluye EGF + FGF2; ver el Ejemplo 6) con la adición de BMP-2 (20 ng/ml) (indicada como "BMP" en la FIGURA 9) o una exposición transitoria a BMP-2 (indicada como "post BMP" en la FIGURA 9) para un pasaje. El análisis de la frecuencia de las células madre tumorales y células progenitoras tumorales usando el método del Ejemplo 1 reveló una reducción significativa en el número de células madre tumorales y de células progenitoras tumorales en ambos grupos BMP. Estos resultados indican que una exposición transitoria a BMP-2 produce una reducción permanente en la frecuencia de las células madre tumorales y de las células progenitoras tumorales, incluso en presencia de los mitógenos EGF y FGF2. Estos resultados indican que el tratamiento con BMP-2 tendrá un efecto duradero sobre el crecimiento del tumor cerebral en seres humanos.

Ejemplo 13: Tumorigenicidad reducida de células GBM cultivadas después del tratamiento previo con LIF y BMP

El trasplante de 100.000 células madre neurales tumorales de GBM humano en el cerebro (estriado ventrolateral) de ratones inmunodeficientes se realizó usando inyección estereotáctica. Las células madre neurales tumorales establecieron GBM en los ratones. Estas lesiones de GBM se hicieron evidentes como áreas hipernucleadas amplias distinguidas claramente por el tejido normal (ver la FIGURA 10, panel superior). Cuando las mismas células madre tumorales neurales tumorales se pretrataron con BMP-4 100 ng/mL o LIF 100 ng/mL durante 48 horas antes del trasplante, la formación del tumor se reduce enormemente (aproximadamente en un 80%) y las áreas hipernucleadas a menudo son difíciles de detectar (ver FIGURA 10, panel inferior). Estos resultados indican además que el tratamiento con BMP y/o LIF es efectivo en el tratamiento de tumores cerebrales humanos. Ver también el Ejemplo 22 para un Ejemplo adicional.

Ejemplo 14: Ensayo para la frecuencia de células madre tumorales en tejido de carcinoma de mama después del tratamiento de LIF y BMP-2

Las muestras tumorales se obtienen de pacientes que consienten y se someten a biopsias para la resección tumoral y se digieren enzimáticamente en una solución 1: 1 de colagenasa/hialuronidasa durante 1 hora a 37 °C, seguido de filtración a través de un filtro de 40- μ m y siembra de células a una densidad clonal en mezcla de hormonas DMEM/F12 libre de suero (NeuroCult, Stem Cell Technologies) con los mitógenos EGF y FGF2 (20 ng/ml). Después de 3-5 días, se observan grupos de células derivadas clonalmente que flotan en suspensión. Estas células se recolectan, se disocian enzimáticamente y las células se vuelven a sembrar en medio de crecimiento fresco. Las células pasadas de esta manera cada 4-7 días muestran un aumento geométrico en el número total de células generadas.

Las células madre derivadas de tumores mamarios pasadas en serie se exponen a LIF y/o BMP-2 y se compararon con cultivos de control. La frecuencia de células madre tumorales y progenitoras tumorales entre los grupos de

tratamiento y control se analiza mediante la siembra de células de esferas mamarias disociadas en el ensayo de células formadoras de colonias neurales y analizando las curvas de crecimiento seriado con el modelo matemático del Ejemplo 1.

Ejemplo 15: Ensayo para la frecuencia de células madre tumorales en tejido de carcinoma prostático después del tratamiento con LIF y BMP-2

Las células de cáncer de próstata se obtienen a partir de metástasis de ganglios linfáticos y se cultivan en la mezcla de hormonas DMEM/F12 (StemCell Technologies) con la adición de suero 5% y los mitógenos de células madre EGF y FGF2. Los esferoides derivados clonalmente se pasan en forma seriada después de la tripsinización y los datos de expansión de las células pasadas (no tratadas o tratadas con LIF y/o BMP-2) se usan para calcular la frecuencia de células madre tumorales y progenitoras tumorales usando el modelo matemático del Ejemplo 1.

Ejemplo 16: Ensayo para la frecuencia de células madre tumorales en tejido de melanoma después del tratamiento con LIF y BMP-2

Las células de melanoma se obtienen de tumores resecados y las células madre se aíslan según los métodos utilizados para cultivar células madre multipotentes de piel de mamífero (ver Toma et al, Nat Cell Biol. 2001 Sep;3(9):778-84). Brevemente, el tejido se corta en trozos pequeños (<2 mm), se lava con HEM y se digiere con tripsina 0,1 durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras se lavan en PBS, se disocian mecánicamente en una suspensión de células única, se filtran a través de un filtro de células de 40 µm y se siembran a una densidad de 50.000 células por ml en matraces de cultivo de tejidos Nunc T-80. El medio de cultivo es DMEM/F12 libre de suero con mezcla de hormonas (StemCell Technologies) con la adición de los mitógenos de células madre EGF y FGF2. Después de 7-10 divisiones, se identifican grupos de células derivadas clonalmente en cultivo. Estas melanosferas se recogen, se disocian en una suspensión de células únicas y se vuelven a sembrar usando mitógenos de células madre de medio fresco. Los cultivos pasados de esta manera se tratan con LIF o BMP-2 y el número total de células generadas a lo largo del tiempo se grafica en un escala logarítmica. La frecuencia de células madre tumorales y progenitoras tumorales entre los grupos de tratamiento y control se analiza utilizando el modelo matemático del Ejemplo 1.

Ejemplo 17: Tratamiento de glioblastoma multiforme recurrente usando la administración de LTF por administración aumentada por convección (CED) después de la resección tumoral

Se seleccionan pacientes con glioblastoma multiforme recurrente. Después de la resección tumoral, se colocan de dos a tres catéteres en el parénquima cerebral que rodea la cavidad de resección usando una guía de imagen para evitar la entrada a los surcos o ventrículos. Se infunden setenta y dos ml de LIF humano a 1 µg/mL a través de los catéteres durante 96 horas utilizando una bomba de jeringa.

Ejemplo 18: Tratamiento del glioblastoma multiforme recurrente usando la administración de BMP-4 con perlas de polímero

Se seleccionan pacientes con glioblastoma multiforme recurrente. Después de la resección del tumor, se implantan perlas poliacrílicas saturadas de BMP-4 (que liberan BMP-4 durante más de una semana) en el sitio de resección.

Ejemplo 19: Expresión de BMPR en células de especímenes de GBM

La expresión de BMP y sus transcriptos de receptor (BMPR) y proteínas en células derivadas de tejido GBM se evaluaron en la población tNSC CD133+ derivada de tejido GBM (Singh, S. K. et al., Nature 432, 396-401 (2004)). Mientras que los datos in vitro a continuación ilustran los datos obtenidos de células de un espécimen de GBM representativo, se obtuvieron resultados equivalentes con cuatro muestras adicionales, que incluyen células clasificadas o no clasificadas CD133+, ya se aisladas completamente de GBM o después de un breve cultivo con mitógenos (células cultivadas) (Galli et al, Cancer Res 64, 7011-21 (2004); Singh, S. K. et al., Nature 432, 396-401 (2004)). Se encontraron transcriptos para los tres subtipos BMPR (BMPR1A,-1B,-2) y BMP tanto en células GBM disociadas completamente y cultivadas. Ver la FIGURA 11A donde el carril 1 es un control negativo, el carril 2 es células GBM CD 133+ disociadas completamente, el carril 3 es células GBM CD 133+ cultivadas, y el carril 4 es células MCF7 como control positivo. Además, el receptor cognado y las proteínas BMP-4 se encontraron en ambas poblaciones, en las fracciones CD133+ y CD133. Ver la FIGURA 11B-G que representa la inmunofluorescencia de las proteínas indicadas en las células CD133+ GBM recientemente aisladas (FIGURA 11B-D) y cultivadas (FIGURA 11E-G).

Los BMPR fueron funcionales, ya que se observó la fosforilación de Smad 1-5-8 después de la adición de concentraciones saturantes de BMP-4 (100 ng/ ml), uno de los ligandos más efectivos, mientras que no se detectó activación de la vía p38 MAPK. Ver la FIGURA 11H-J, que muestra la fosforilación y la translocación nuclear de las proteínas Smad activadas por receptor (antiphosphoSmad 1,5,8) en los tiempos indicados (en minutos) en células de GBM.

La FIGURA 11K-P muestra un análisis de transferencia de Western de las proteínas indicadas. FIGURA 11K muestra la proteína BMP-4 en células GBM CD133+ disociadas completamente (carril izquierdo) y cultivadas (carril derecho).

La FIGURA 11L muestra que los niveles de Smad1 no se modificaron en las células cultivadas tratadas con BMP-4 (el carril izquierdo es control, el carril derecho se trata con BMP-4). La FIGURA 11M-N muestra una fosforilación incrementada de Smad 1,5,8 en presencia de BMP-4 (controles de los carriles izquierdos, los carriles derechos se tratan con BMP-4) en células recién disociadas (FIGURA 11M) y cultivadas (FIGURA 11N). La FIGURA 11O-P muestra una expresión aumentada de Smad4 en células GBM cultivadas (FIGURA 11O) y disociadas completamente (FIGURA 11P) después del tratamiento con BMP-4 (control en los carriles izquierdos, tratamiento con BMP-4 en los carriles derechos).

Este resultado también indica que el complejo Smad 1,5,8 también puede ser un blanco terapéutico útil para el tratamiento de GBM. Por ejemplo, los agentes terapéuticos que aumentan la fosforilación del complejo tendrán el mismo efecto en tNSC que BMP-4. Los métodos de selección descritos en otra parte en esta descripción se pueden usar para obtener tales agentes terapéuticos.

Ejemplo 20: Estudio del efecto de la exposición de BMP-4 en tNSC de GBM

Se estudió la naturaleza del efecto de BMP-4 en células aisladas de GBM. Diferente de otros sistemas celulares (Hallahan et al, Nat Med 9, 1033-8 (2003); Zuzarte-Luis & Hurle, Semin Cell Dev Biol 16, 261-9 (2005); Hruska et al, Circ Res 97, 105-14 (2005)), que incluyen meduloblastomas (Graham et al., Mol Cell Neurosci 8, 76-83 (1996)), BMP-4 no produjo muerte celular (medida por la exclusión de yoduro de propidio) o apoptosis (medida por el Ensayo TUNEL), pero redujo significativamente la proliferación (medida por inmunofluorescencia Ki67) de células GBM en respuesta a mitógenos. La FIGURA 12A muestra gráficamente los efectos de BMP-4 en cultivos de GBM (las columnas vacías son cultivos de control, las columnas negras son tratadas con BMP-4, media \pm SE, n = 3; * p, 0,005; PI = yoduro de propidio).

Los efectos de otras BMP sobre la proliferación también se analizaron. Vea la FIGURA 15 que muestra los efectos de otras BMP (100 ng/ml) en el crecimiento de las células GBM. BMP-2,-4,-5,-6,-7,-8b inhiben el crecimiento celular, mientras que BMP1,-3 y-3b parecen ser ineficaces, similares a TGF β 1 y 2 y a TGF β 1.2 (un polipéptido agonista de TGF β quimérico) (todos a 100 ng/ml), que también fueron ineficaces. * p <0,005 BMP versus control, media \pm SE n = 3, prueba t de Student de dos colas; **p <0,001 BMP4 versus control, media \pm SE n = 3, prueba t de Student de dos colas. Por lo tanto, BMP-2,-4,-5,-6,-7,-8b también serán útiles en los métodos y composiciones de la descripción, particularmente para el tratamiento de GBM.

El efecto antiproliferativo de BMP-4 fue corroborado por el análisis del ciclo celular, que muestra un aumento significativo en el número de células GBM en la fase G0/G1 y una disminución en el porcentaje de células en la fase S en respuesta a BMP-4. A diferencia de BMP4, los TGF β hallados en las células GBM (Kjellman et al., Int J Cancer 89, 251-8 (2000)), usando vías de señalización que se superponen con las de las BMP (Canalis et al., Endocr Rev 2, 218-35 (2003); Golestaneh et al, Oncogene 24, 5722-30 (2005)) y que provoca efectos pro o antimicóticos (Jennings et al., J Neurooncol 36, 123-40 (1998)) no afectaron la proliferación de células GBM, subyacente a la especificidad de las acciones de BMP4 descritas en la presente.

Dos ensayos clásicos, uno que determina el índice clonogénico, que mide el porcentaje de precursores neuronales formadores de clones (Gritti et al., J Neurosci 16, 1091-100 (1996); Reynolds et al., Dev Biol 175, 1-13 (1996)) y un segundo que proporciona una medición de la expansión del tamaño de la mezcla de NSC sobre la base de los datos de cinética de crecimiento (Galli et al., Development 129, 1633-44 (2002); Reynolds et al., Nat Methods 2, 333-6 (2005))-confirmaron que el efecto citostático de BMP-4 incidía sobre la población de tNSC en células GBM. Una exposición de 48 horas a BMP-4 produjo una reducción superior a 70% en el índice clonogénico (% de clones formados en relación con las células totales sembradas) en células GBM, in vitro (ver la FIGURA 12B que muestra gráficamente el índice clonogénico para control y las células GBM tratadas con BMP-4, tanto disociadas completamente como cultivadas, media \pm SE, n = 3; * p <0,005). Además, la exposición de las células GBM a BMP-4 poco después del aislamiento del espécimen de tumor primario anuló su capacidad de experimentar expansión en cultivo, mientras que la adición de BMP4 a células GBM que ya se estaban expandiendo in vitro, disminuyó en gran medida su tasa de crecimiento. Ver la FIGURA 12C que representa gráficamente la propagación de células GBM in vitro usando el Ensayo de neuroesfera, que revela que las células del tejido de GBM disociadas completamente no se pueden subcultivar en serie en presencia de BMP-4 (línea de puntos negra y triángulo negro lleno). La FIGURA 12C también muestra que después de una breve expansión bajo las mismas condiciones (rombos) las células del mismo tejido disociadas completamente que se trataron con BMP-4 también mostraron una reducción significativa en la pendiente de su curva de crecimiento (cuadrados). Se observó un efecto similar para las NSCs fetales humanas tratadas con BMP4 (ver FIGURA 12C, estrellas negras (control) versus círculos negros (BMP-4)), mientras que las líneas de glioma humano U87 (que no portan BMPR) no fueron afectadas (ver la FIGURA 12C, triángulos abiertos, control versus cruces (BMP-4)).

El análisis citofluorimétrico mostró que el tratamiento con BMP4 dio como resultado un tamaño de casi mitad de la población de CD133+ (ver la FIGURA 12A), tanto en células GBM disociadas completamente como cultivadas. En conjunto, estos datos indican que BMP-4 se puede dirigir a la población de tNSC en células GBM.

La exposición de las células GBM a BMP-4 dio como resultado cambios morfológicos evidentes, in vitro. En relación con las células cultivadas solo con mitógenos, las células que recibieron también BMP4 adoptaron una morfología más

diferenciada (plana, fase oscura, con procesos elaborados). Ver la FIGURA 13A que muestra las células de control y la FIGURA 13B que muestra las células después de una exposición de 48 horas a BMP-4. En consecuencia, se observó un aumento considerable en la expresión de marcadores astrogiales (inmunorreactividad GFAP [IR]), junto con un aumento menos intenso de la marcación para marcadores neuronales (β III-tubulina y MAP5) u oligodendrogiales (GalC). Ver la FIGURA 13C-H. Específicamente, la FIGURA 13C (control) y la FIGURA 13D (BMP-4) muestran GFAP-IR; La FIGURA 13E (control) y la FIGURA 13F (BMP-4) muestran β III-tubulina IR; La FIGURA 13G (control) y la FIGURA 13H (BMP-4) muestran GalC IR.

La cuantificación del efecto de BMP4 mediante el recuento del número de células que expresan marcadores de diferenciación específicos fue difícil debido a la expresión aberrante de antígenos neuronales y gliales en cultivos de GBM que proliferan indiferenciados y dentro de la misma célula dos fenómenos que no se observan en las células madre neurales normales. Por lo tanto, el análisis citofluorimétrico se usó para medir la intensidad de señal de fluorescencia y descubrió que, en relación con el control, los cultivos tratados con BMP-4 exhibían un aumento mayor que dos veces de GFAP-IR (ver FIGURA 13I) y un aumento consistente, aunque no significativo en la inmunorreactividad de β III-tubulina (FIGURA 13J) y GalC (FIGURA 13K) (MEFF = moléculas de fluoresceína equivalente; MEFE = moléculas de ficoeritrina equivalente).

Sin estar limitado por teoría o hipótesis, se cree que los efectos actualmente descritos de BMP-4 se producen ya sea a través de una reducción en el número de divisiones simétricas que producen dos hijas idénticas que son, ellas mismas tNSC, o una diferenciación de una fracción de los tNSC de modo que ya no sean capaces de retener las propiedades de las células madre. En conjunto, esto sugiere que BMP-4 puede anular la estimulación mitogénica, imponer la adquisición de un fenotipo más maduro y menos tumorigénico por tNSC. Este efecto es inesperado porque BMP-4 ejerce un efecto anti-diferenciación en las células ES humanas, lo que aumenta la mezcla de células madre y la tasa de expansión.

Ejemplo 21: BMP-4 inhibe el potencial tumorigénico de GBSCs y se puede suministrar in vivo

Las células CD133+ GBM tanto precisamente disociadas como cultivadas se expusieron a BMP-4 durante 48 horas en cultivo, antes de la inyección unilateral, intraestriatal (3×10^5 células viables) en ratones *scid/bg* inmunodeficientes. La formación y la expansión del tumor se compararon con aquellas de los animales de control que recibían células G mantenidos en condiciones idénticas, pero sin BMP-4.

Todos los animales que recibieron células de GBM no tratadas desarrollaron masas tumorales bien establecidas en el lado inyectado (ver la FIGURA 14A). Mostraban característicos rasgos de glioblastoma, incluyendo marcada atipia nuclear, expresión de elementos gliales aberrantes, extensa neovascularización y alta actividad mitótica (Galli et al. Cancer Res 64, 7011-21 (2004)) e invadieron los ventrículos lateral, tercero y cuarto. Por el contrario, las células tratadas con BMP4 no formaron tumores invasivos, pero pequeñas lesiones delimitadas, que se confinaron al sitio de inyección, tenían un bajo índice mitótico y no mostraban una invasión ventricular (ver la FIGURA 14B). Entre tres y cuatro meses después de la inyección, todos los animales de control murieron, mientras que virtualmente todos los ratones que recibieron células pretratadas con BMP-4 sobrevivieron (ver la FIGURA 14J que representa la supervivencia gráficamente en paradigmas de pretratamiento (panel izquierdo), cotratamiento (panel central) y postratamiento (panel derecho) (ensayo de Logrank, $p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p < 0,005$, respectivamente). Se observaron idénticos resultados cuando se purificó la fracción residual de CD 133+ de cultivos de GBM tratados con BMP-4 por FACS y su tumorigenicidad se comparó con aquella de una cantidad igual ($1,5 \times 10^5$ células CD133+/animal) de células CD133+ purificadas de células GBM de control. Además, como se mostró previamente (Galli et al. Cancer Res 64, 7011-21 (2004); Singh et al., Nature 432, 396-401 (2004)), siempre era posible recultivar tNSCs CD133+ (frecuencia clonogénica promedio: $9,0 \pm 1,3\%$ [$n = 2$, 90 días después del trasplante]) del cerebro de ratones que recibían células GBM de control precisamente disociadas. Cuando se retrasplantan en el cerebro de ratones *scid/bg* por vía intracerebral, dan origen a grandes tumores secundarios. Por el contrario, nunca fue posible cuando los animales recibían células GBM pretratadas con BMP-4 en el trasplante primario, ni fuera posible establecer tumores secundarios por inyección directa de 3×10^5 células, que se disociaron en forma precisa de los tumores primarios de estos mismos ratones.

Tomados juntos, estos hallazgos demuestran que incluso la exposición transitoria a BMP-4 agota la población de GBM tNSC y produce una prominente reducción de la capacidad de inicio de tumores in vivo de las células GBM. Ver también el Ejemplo 13.

Ejemplo 22: Suministro in vivo de BMP-4 evita el establecimiento y el crecimiento de tumores intercerebrales

El suministro in vivo de BMP-4 se evaluó luego como un tratamiento para prevenir el establecimiento y el crecimiento tumoral intercerebral. El trasplante de GBM fue acompañado por inyección de perlas poliacrílicas saturadas con portador (control) o BMP-4 (liberando BMP-4 durante 1 semana), en el sitio del injerto de las células, ya sea al mismo tiempo que las células (paradigma de cotratamiento) o diez días después (paradigma de postratamiento). La reconstrucción serial histológica en ambos tratamientos reveló una reducción significativa en la máxima extensión de la masa tumoral en los animales tratados con BMP-4 versus los controles. Específicamente, en todas las configuraciones experimentales, los animales que recibían las perlas de control desarrollaron grandes tumores malignos (FIGURA 14C (células GBM cultivadas, 4 semanas posinyección, paradigma de cotratamiento); FIGURA

14E (células GBM recién aisladas, 30 días después de la inyección celular, paradigma de postratamiento) y murieron pronto (FIGURA 14J), mientras que los ratones implantados con perlas liberadoras de BMP4 mostraron pequeñas lesiones confinadas (FIGURA 14D (células GBM cultivadas, 4 semanas posinyección, paradigma de cotratamiento); FIGURA 14F (células GBM recién aisladas, 30 días después de la inyección celular, paradigma de postratamiento)); y sobrevivieron significativamente más tiempo (FIGURA 14J). Los tumores de control contenían elementos pleomórficos, altamente neoplásicos, con cromatina reactiva y células infiltrantes muy malignas (FIGURA 14G). Por el contrario, los animales tratados con BMP-4 mostraban lesiones que incorporaban pequeñas lesiones neoplásicas, muchos elementos muy diferenciados y numerosos macrófagos (FIGURA 14H). El índice mitótico era significativamente mayor en controles respecto a los animales tratados con BMP-4 (cotratamiento: control $3,8 \pm 0,2$ versus BMP-4 $0,20 \pm 0,1$; $p < 0,01$. Postratamiento: control $4,3 \pm 0,3$ versus BMP-4 $0,7 \pm 0,3$; $p < 0,05$. Media \pm SE, $n = 4$, prueba t de Student de dos colas). La inmunofluorescencia in vivo reveló la presencia de astrocitos y células positivas en nestina, pero no células oligodendrogiales o neuronales, tanto en tumores tratados con control y con BMP-4.

Estos resultados indican que el implante intracerebral de un dispositivo que libera o suministra de otro modo BMP-4 serán eficaces en el tratamiento de GBM en humanos.

Ejemplo 23: Estudios de anticuerpos de BMP-4 neutralizantes

El Ejemplo 19 muestra que BMP-4 endógena y otras BMPs se hallan en células GBM. De acuerdo con los hallazgos presentados en los ejemplos anteriores, los anticuerpos anti-BMP4 neutralizantes incrementan la proliferación de fNSC. Esto sugiere que las BMPs endógenas pueden actuar fisiológicamente en células GBM in vivo, a pesar de que sus efectos son insuficientes para detener el crecimiento del tumor. El estudio de los mecanismos detrás de este fenómeno, por ejemplo, la presencia posible de antagonistas de BMP endógenas en el tumor (Canalis et al., *Endocr Rev* 2, 218-35 (2003)), puede apuntar a estrategias alternativas para la cura de GBMs. Además, BMPs, sus receptores cognados y sus mecanismos de transducción intracelular asociada, en particular la vía Smad, emergen como un blanco promisorio para terapias dirigidas más específicamente a las células principalmente responsables del establecimiento y la expansión de GBM.

Ejemplo 24: Cultivo primario, propagación de cultivo, clonación y establecimiento de línea celular

Se obtuvieron células GBM por procesamiento de muestras tumorales como se describe por Galli et al., *Cancer Research* (2004) 64: 7011-7021. Las células precisamente disociadas se clasificaron respecto de su inmunorreactividad por CD133 (ver más abajo) y se plaquearon en matraces de cultivo tisular de 25 cm² a una densidad final de 2500 células/cm² en medio libre de suero NeuroCult® NS-A (Stem Cell Technologies). La propagación del cultivo, ensayo clonogénico y análisis de la población se llevaron a cabo usando las mismas condiciones descritas previamente por Galli et al., *Development* 129, 1633-44 (2002). Para el pretratamiento de células CD133+ GBM precisamente disociadas con BMP4, se plaquearon en el mismo medio carente de mitógenos (control) o con contenido de 100 ng/ml de BMP4 durante 48 horas antes del trasplante.

Ejemplo 25: Inmunoquímica

$2,5 \times 10^4$ células/cm² de células GBM se plaquearon en cubreobjetos de vidrio recubiertos con Matrigel en presencia de FGF2/EGF y se trataron con BMP4 (100 ng/ml) durante 48 h. Las células luego se lavaron y se fijaron en 4% de paraformaldehído (10 minutos). Se llevó a cabo una múltiple inmunofluorescencia para antígenos neurales (GFAP, Dako Corporation; Tuj1, Babco; Gale, Chemicon) como describen Galli et al., *Cancer Research* (2004) 64: 7011- 7021. La tinción con Ki67 (1:1000, NovoCastra, Newcastle, RU) detectó células proliferantes.

Después de fijar en 4% de paraformaldehído, la inmunotinción para BMPR-1A, -1B y -2 se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (1:50 R&D Systems). Cuando se teñía para phospho-Smad 1 (1:100 Cell Signaling, Beverly, MA), las células se trataron con BMP-4 (100 ng/ml) en diferentes momentos (de 5 minutos a 2 horas). Los controles isotípicos o negativos apropiados siempre se incluían en estos procedimientos. Las células apoptóticas se detectaron usando una modificación a base de digoxigenina del método original TUNEL introducido por Gavrieli et al., *J Cell Biol* 119, 493-501 (1992) usando el ensayo TUNEL de fluoresceína-dUTP (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Applied Science). Brevemente, las células cultivadas en cubreobjetos de 12 mm se fijaron en 4% de paraformaldehído durante 10 min a temperatura ambiente y luego se enjuagaron en PBS. Las células luego se permeabilizaron durante 2 min en hielo antes de rotular con 50 μ l de mezcla de reacción TUNEL y se incubaron a 37 °C durante 1 hora en una cámara humidificada bajo cubreobjetos de parafilm. Después de lavar con PBS, los cubreobjetos se montaron en Vectashield™ con contenido de DAPI y se examinaron con microscopio de fluorescencia. Para tinción con yoduro de propidio (PI), las células se fijaron en 4% de paraformaldehído durante 10 min a temperatura ambiente, se enjuagaron en PBS y se incubaron con PI (1 μ g/ml) durante 5 min a temperatura ambiente. Después de lavar, los cubreobjetos se montaron en Vectashield™ con contenido de DAPI y se analizaron con microscopio de fluorescencia. La exclusión de PI mostró células viables. Para los ensayos en el Ejemplo 19, se ejecutaron muestras en seis replicaciones para cada condición ensayada.

Ejemplo 26: PCR convencional y en tiempo real

El ARN total se aisló de células GBM cultivadas y precisamente disociadas usando reactivo TRIzol (Life Technologies, Rockville, MD) y se transcribieron inversamente usando Superscript RNase H-Reverse Transcriptase (Life Technologies). Las cantidades de cADN usado como plantillas en las reacciones convencionales de PCR se normalizaron con referencia a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las líneas celulares MCF-7 se usaron como controles positivos para BMPRs. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio.

Se corrieron reacciones cuantitativas de RT-PCR por triplicado usando Brilliant® SYBR® Green QPCR Core Reagent Kit (Stratagene, La Jolla, CA). La tintura SYBR Green se une con cualquier producto de PCR y, por ello, no requiere del uso de sondas específicas de secuencias. La emisión fluorescente se registró en tiempo real (Chromo 4 Four-Color Real-Time PCR Detector, MJ Research, Bio-Rad). El perfilado de la expresión génica se completó usando el método comparativo de Ct de cuantificación relativa. Las cantidades de ARN relativas normalizaron a dos controles endógenos, GAPDH y 18S ARN ribosomal (18S rARN).

Para la PCR convencional, se usaron los siguientes cebadores: BMP4, directo: 5'- cttcagtctggggaggag-3', inverso: 5'-gatgaggtgccagcac-3'; BMPR1A, directo: 5'-aatggagtaacctagcaccagag-3', inverso: 5'-agctgagtgccaggaacctgtac-3'; BMPR1B, directo: 5'-ggttgcctgtggtcactctgg-3', inverso: 5'-tagtctgtgattaggtacaactgg-3', BMPR2, directo: 5'-tcagatatatggcaccagaagt-3', inverso: 5'-gtggagagctggtgacactg-3'; GAPDH, directo: 5'-cggagtgcaacggatttggctgat-3', inverso: 5'-agccttctccatggtggaagac-3'. Las condiciones de amplificación de PCR consistían en 35 ciclos con cebadores que se fusionaban a 56 °C.

Para la RT-PCR, se usaron los siguientes cebadores: BMPR1A, directo: 5'-caggttctggactcagctc-3', inverso: 5'-ctttcctgggtgccataaa-3'; BMPR1B, directo: 5'-aaaggtgcctatggggaagt-3', inverso: 5'-gcagcaatgaaacccaaaat-3'; BMPR2, directo: 5'-gctaaaattggcagcaagc-3', inverso: 5'-cttggccctatgtgtcact-3'; GAPDH: se usaron los mismos cebadores que los descritos para la PCR convencional; 18S rARN, directo: 5'-agtccctgcccctttgtacaca-3', inverso: 5'-gatccgagggcctcactaaac-3'. La especificidad de los cebadores se confirmó para cada corrida de PCR por análisis de la curva de disociación (Opticon®2 y Chromo4™ Real-Time System Software, MJ Research). Las condiciones de amplificación por RT-PCR consistían en 40 ciclos con cebadores que se funden a 56 °C.

Ejemplo 27: Transferencia Western

Las proteínas se cultivaron por lavado de células GBM cultivadas y precisamente disociadas en PBS frío y lisado con 500 µl de 1X tampón de muestra (62,5 mM de Tris HCl, pH 6,8 a 25 °C; 2% p/v de SDS; 10% de glicerol; 50 mM de DTT; 0,01% p/v de azul de bromofenol). Las muestras se incubaron en hielo y se almacenaron a -20 °C. Las alícuotas se hirvieron durante 5 minutos, se incubaron en hielo y se cargaron 20 µl/carril en gel de SDS-PAGE (10 cm x 10 cm). Las proteínas se transfirieron luego a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en 5% de leche en polvo / 0,1% de Tween en TBS durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con 15 ml de TBS/0,1% de Tween. Las transferencias se incubaron luego con anti-Smad 1-5-8 (1:1000; Cell Signaling), anti-fosfo Smad1-5-8 (1:1000; Cell Signaling), anti-Smad4 (1: 200; Santa Cruz), anti-BMP4 (1:400, Chemicon) en 5% de leche en polvo / 0,1% de Tween en TBS. Para todas las transferencias, las membranas se lavaron 3 veces con 15 ml de TBS / 0,1% de Tween y luego se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con rábano picante apropiado (1:1000, Amersham) en 5% de leche en polvo / 0,1% de Tween en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia (ECL; Amersham).

Ejemplo 28: Citometría de flujo

Para determinar el estado de fosforilación de p38 y Smad 1-5-8, las preparaciones celulares se centrifugaron y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS y 0,5 ml de 4% de paraformaldehído durante 10 min a 37 °C. Las células GBM se permeabilizaron luego por adición lenta de 100% de metanol helado a las células preenfriadas mientras se sometía moderadamente a vórtex, dando una concentración final del 90% de metanol. Después de la incubación durante 30 min a 4 °C y centrifugación, las células se lavaron dos veces con 3 ml de 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) en PBS, se resuspendieron en 150 µl de PBS y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después de incubar, se expusieron a una dilución 1:50 de anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo Smad 1-5-8 (Cell Signaling) o 1:50 de anticuerpo policlonal de conejo de fosfo-p38 MAP quinasa (Cell Signaling) durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de extensos lavados, se añadió una dilución 1:800 de anticuerpo rotulado con Ig FITC de cabra anti-conejo (BD, Pharmingen) y cada tubo se incubó durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de dos lavados con 3 ml de 0,5% de BSA (Sigma) en células PBS se resuspendieron en 0,5 ml de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Los controles de autofluorescencia y de isotipo se ejecutaron de modo rutinario para todos estos ensayos.

Para análisis del ciclo celular, se trató 1 millón de células GBM cultivadas y precisamente disociadas/muestra con BMP4 (100 ng/ml) durante el tiempo indicado. Las células GBM se resuspendieron luego en volúmenes iguales de PBS helado y 100% de etanol y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Después de centrifugar, el pellet celular se lavó 3 X con PBS y se centrifugó durante 5 minutos. Las células GBM se incubaron luego durante la noche en la oscuridad en 1 ml de ARNasa con contenido de PBS (12,5 µg /ml; Sigma) y yoduro de propidio (3 µg/ml; Sigma) y se

analizaron por citometría de flujo.

Para la cuantificación de la expresión de CD133, se realizó una citometría de flujo de doble tinción, usando 7-amino actinomicina D (7AAD) para identificar células viables. Después de lavar en PBS, las células GBM se resuspendieron en tampón de rotulación 7AAD (0,1 M de tampón de fosfato-citrato con contenido de 0,15 M de NaCl, 5 mM de EDTA, 0,5% de BSA y 0,004% de saponina, pH 6,0) antes de añadir 7AAD en una concentración final de 20 μ M como se describe por Toba et al., *J Immunol Methods* 182,193-207 (1995). Después de la incubación de 7AAD durante 5-7 min, las células GBM se incubaron con anticuerpo conjugado monoclonal CD133/1 (CD133)-PE (1:40, Miltenyi Biotec) durante 30 min a 4 °C y se lavaron con 1 ml de medio de cultivo. Las células se centrifugaron luego a 500 x g durante 5 min, se resuspendieron en 0,5 ml de medio de cultivo y se analizaron por citometría de flujo. El mismo análisis también se realizó usando otro anticuerpo conjugado monoclonal CD133/2 (293C3)-PE, para dar idénticos resultados.

La clasificación de las células GBM (MoFlo High Performance Cell Sorter, DakoCytomation) se llevó a cabo usando la misma dilución de anticuerpos conjugados CD133/1 (CD133)-PE y CD133/2 (293C3)-PE. Como se describe por Singh et al. (*Nature* (2004) 432:396-401), las células clasificadas se analizaron respecto de la pureza por citometría de flujo con una máquina FACSCalibur (BD Biosciences) empleando los mismos anticuerpos. La pureza era de al menos el 87% para las fracciones tanto positiva como negativa de CD133.

Para la cuantificación de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), β III-tubulina y galactocerebrosida C (GalC, también a veces mencionada como "GC"), se usó una mezcla de partículas de calibración en arcoíris (8 picos), 3,0-3,4 μ m (BD Biosciences) para la calibración y la intensidad de rotulación celular se expresó como moléculas de ficoeritrina equivalente (MEPE) o moléculas de fluoresceína equivalente (MEFL). Brevemente, para la tinción intracelular se permeabilizaron las células en solución de 0,5 ml de Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) a temperatura ambiente durante 20 min. Las células se lavaron con 2 ml de BD Perm/Wash 1X (BD Biosciences) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Después de centrifugar, se resuspendieron en 0,2 ml de solución BD Perm/Wash 1X (BD Biosciences) que contenía la mezcla apropiada de anticuerpo primario. Para los antígenos de membrana, las células se resuspendieron en 0,2 ml de medio de cultivo y luego se incubaron durante 30 min a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: 1:400 anti-GFAP policlonal (Dako Corporation), anti- β III-tubulina monoclonal (Babco) y anti-galC monoclonal (Chemicon). Las células luego se lavaron y se expusieron durante 30 min a 4 °C al anticuerpo secundario. En el caso de antígenos intracelulares, era 1:800 anticuerpo rotulado con Ig FITC de cabra anticonejo o anticuerpo rotulado con IgG R-PE de cabra antirratón (BD, Pharmingen), mientras que para los antígenos de membrana se usaron 1:1000 de IgM antirratón de cabra F(ab')₂ conjugado con FITC o IgM antirratón de cabra conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch). Después de un extenso lavado, las células se resuspendieron y se analizaron por citometría de flujo.

Para todos los ensayos anteriores, los análisis se llevaron a cabo por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences) usando software CellQuest (BD Biosciences). La fluorescencia de fondo se estimó sustituyendo los anticuerpos primarios específicos con controles isotípicos específicos. La medición de la autofluorescencia también se realizó por rutina para cada condición ensayada.

Ejemplo 29: Evaluación de la tumorigenicidad por inyección ortotópica e inmunohistoquímica

La tumorigenicidad se determinó por trasplante ortotópico de células GBM ya sea crecidas en condiciones de control o con la ulterior adición de 100 ng/ml de BMP-4 durante 48 horas. Antes del trasplante, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS (10⁸ células/ml). Tres microlitros se inyectaron estereotácticamente en el striatum derecho de ratones inmunodeficientes como se describió previamente en Galli et al., *Cancer Research* (2004) 64: 7011-7021. El suministro a base de polímeros de BMP-4 se llevó a cabo usando perlas acrílicas de heparina cargadas con BMP-4 (100 perlas/animal; Sigma-Aldrich). Antes del trasplante, las perlas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en PBS solo o con contenido de 0,65 μ g/ μ l de BMP4 y se enjuagaron bien 2X3 veces con PBS antes de la implantación. La tinción con hematoxilina y eosina y la inmunohistoquímica se realizaron en secciones microtomales de 4 μ m de espesor incluidas en parafina, procesadas como se describió previamente por Galli et al., *Cancer Res* 64, 7011- 21 (2004).

Se realizó un gráfico con pendiente descendente de la probabilidad acumulativa (eje y) de supervivencia durante períodos de tiempo (eje x) usando el software MedCalc (Mariakerke, Bélgica). Se determinaron significativas diferencias en la supervivencia mediante el ensayo de Longrank.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica de una preparación de proteína de factor inhibidor de la leucemia (LIF) para usar en un método de tratamiento de un tumor de glioblastoma multiforme (GBM), en donde el potencial tumorigénico de células madre neurales tumorales en el tumor GBM se inhibe irreversiblemente.
- 5 2. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde la preparación de LIF comprende el factor inhibidor de la leucemia (LIF) humano de longitud total o un fragmento del factor inhibidor de la leucemia (LIF) humano de longitud total que retiene una capacidad para atenuar la proliferación celular excesiva.
3. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde el método de tratamiento comprende poner en contacto el tumor GMB con la composición farmacéutica que comprende la preparación de LIF.
- 10 4. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéutica reduce la probabilidad de una célula madre tumoral o célula progenitora tumoral sometida a división simétrica.
5. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde un aumento en la señalización mediada por LIFR
- 15 (a) da como resultado la modulación de una o más propiedades de células madre tumorales y células progenitoras tumorales que incluyen las propiedades de supervivencia, autorrenovación, proliferación, división simétrica o diferenciación; o
- (b) da como resultado la alteración de la probabilidad de división simétrica o reducción de la frecuencia del ciclo celular exhibido por células madre tumorales proliferantes y células progenitoras tumorales, llevando a una reducción de las cantidades de células madre tumorales y células progenitoras tumorales.
- 20 6. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde la composición tiene un efecto de prodiferenciación sobre las células madre neurales tumorales y, por lo tanto, reduce de forma permanente el pool de células madre neurales tumorales sin lograr la viabilidad celular o producir apoptosis.
7. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde el suministro de la preparación de LIF es por implante intracerebral, infusión intracerebroventricular (ICV) y/o difusión mejorada por convección (CED).
- 25 8. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica está asociada con perlas poliméricas u obleas poliméricas impregnadas con la preparación de LIF.
9. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde la composición comprende una cantidad terapéutica de una quimioterapia seleccionada del grupo que consiste en carmustina, cisplatino, paclitaxol, temozolomida, PCV (procarbazona, lomustina y vincristina) e IL13-PE38QQR.
- 30 10. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde la preparación de LIF contiene una variante de LIF humano que retiene la capacidad de atenuar la proliferación celular excesiva.
11. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en donde la preparación de factor inhibidor de la leucemia (LIF) comprende además BMP-2 humano.

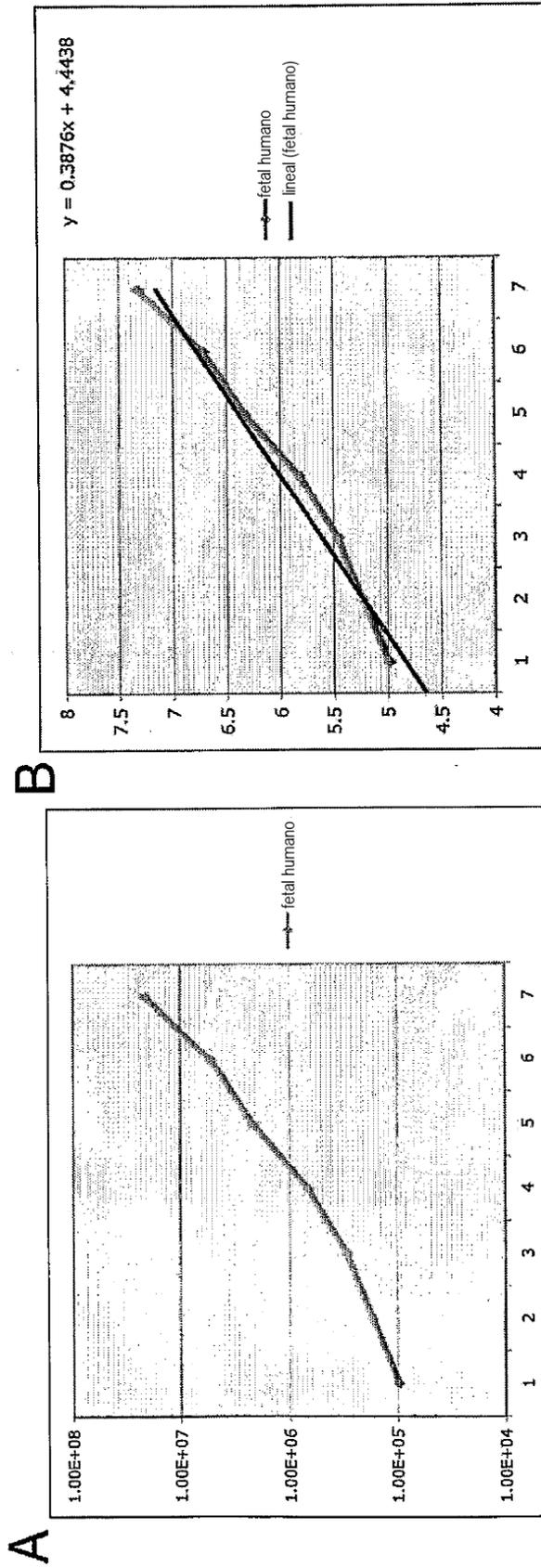
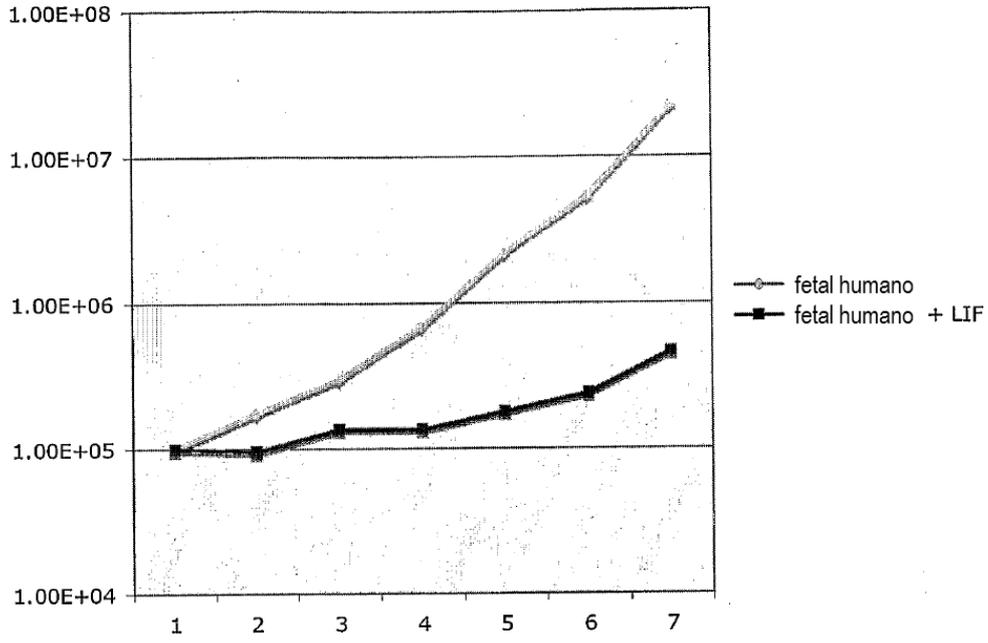
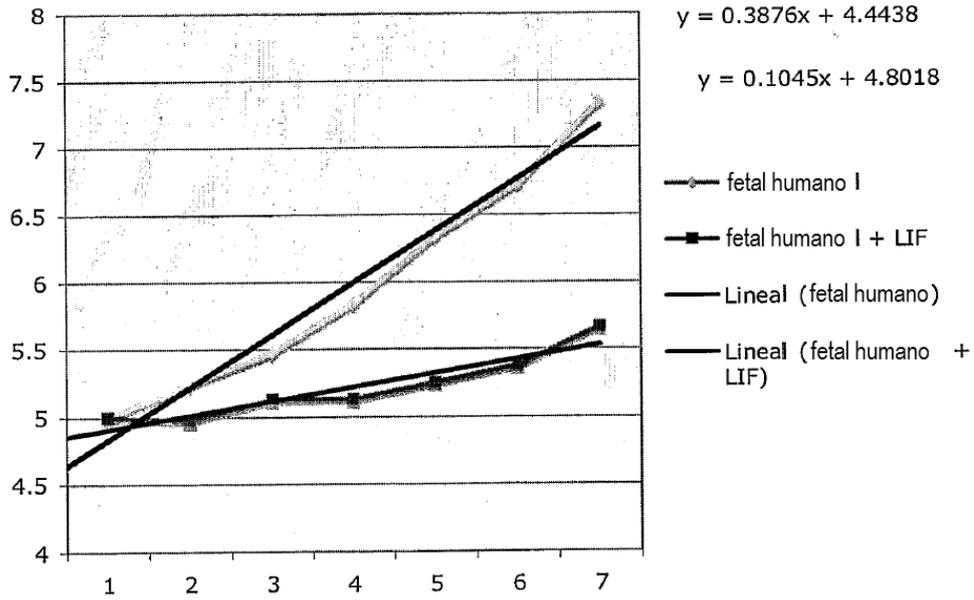


FIGURA 1

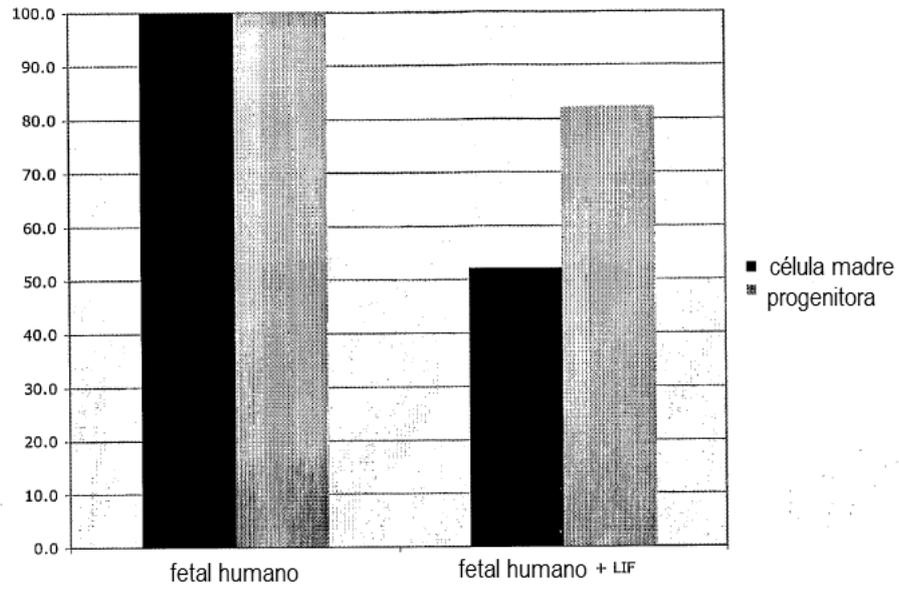


A



B

FIGURA 2



C

FIGURA 2 (Cont.)

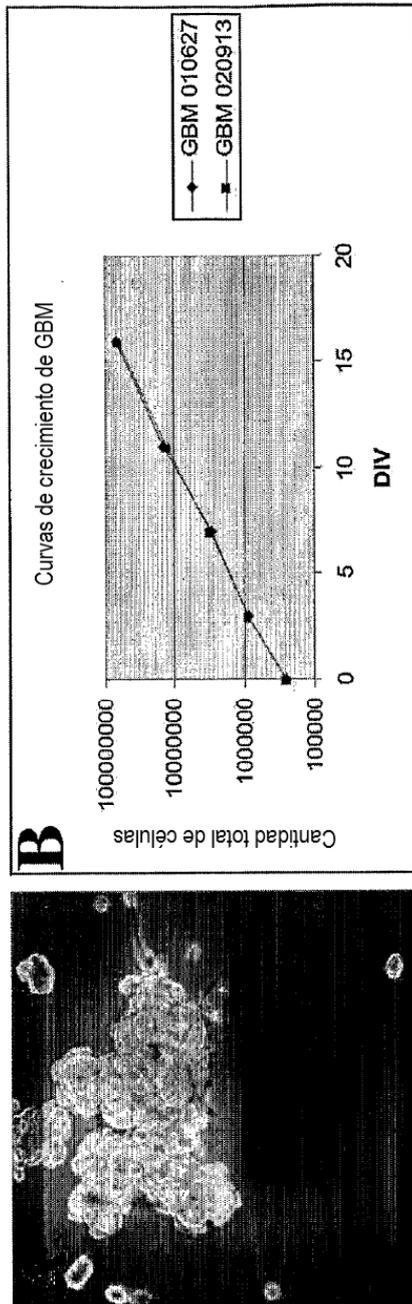
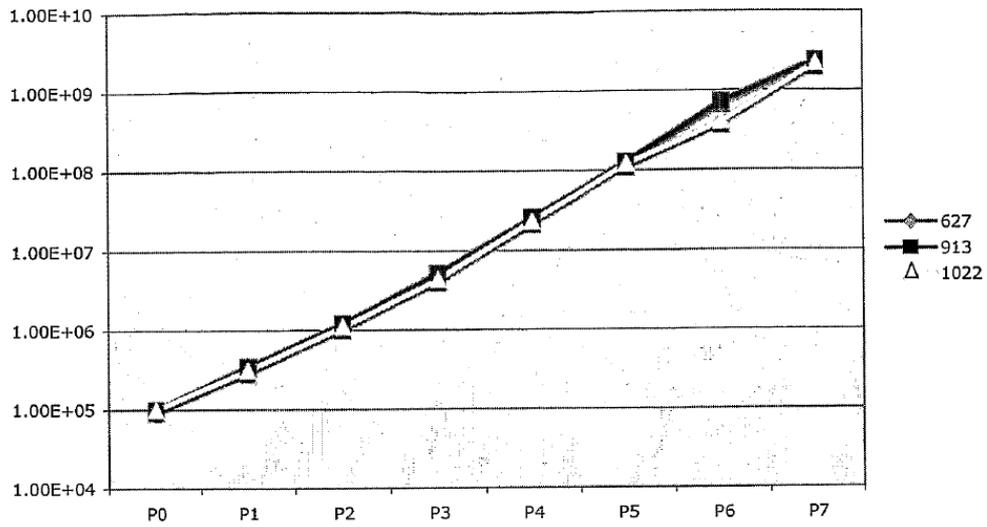
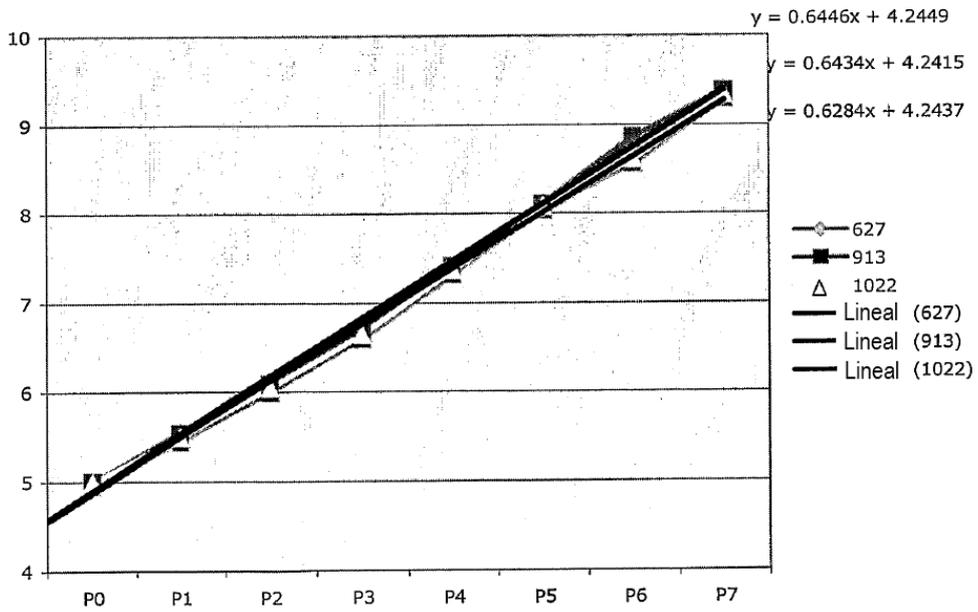


FIGURA 3



A



B

FIGURA 4

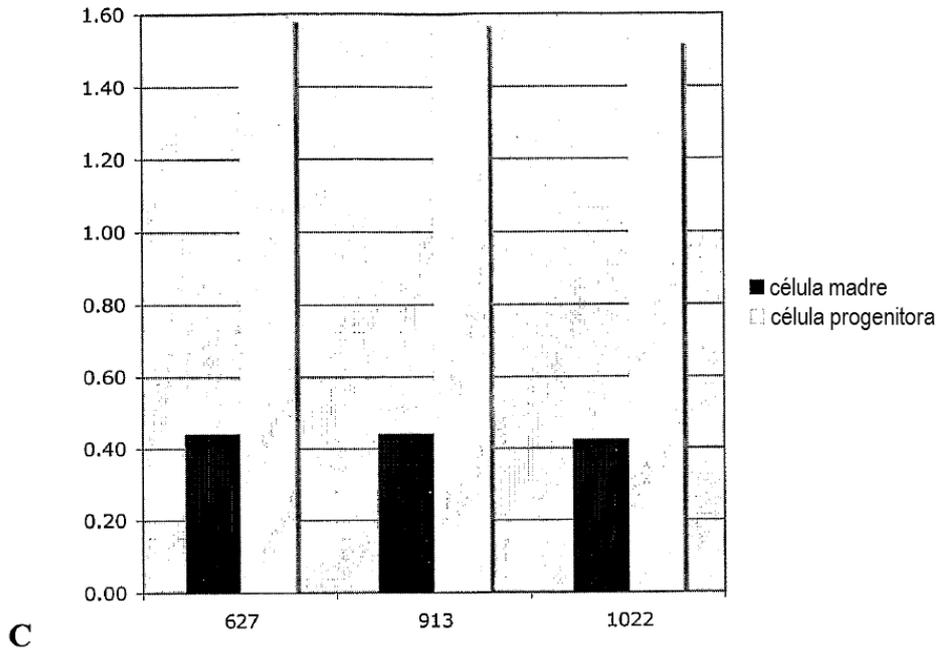


FIGURA 4 (Cont.)

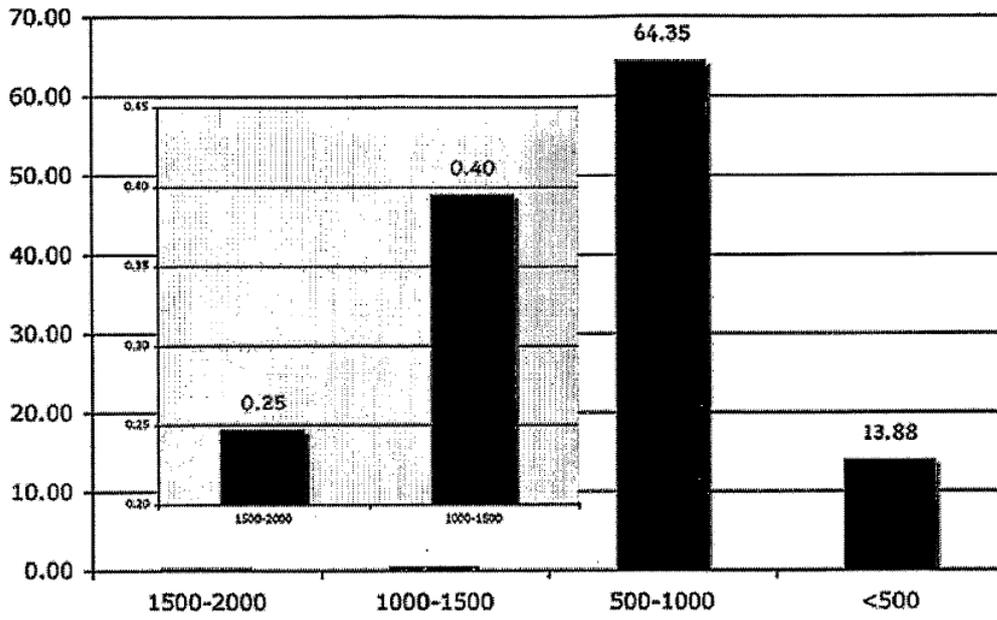


FIGURA 5

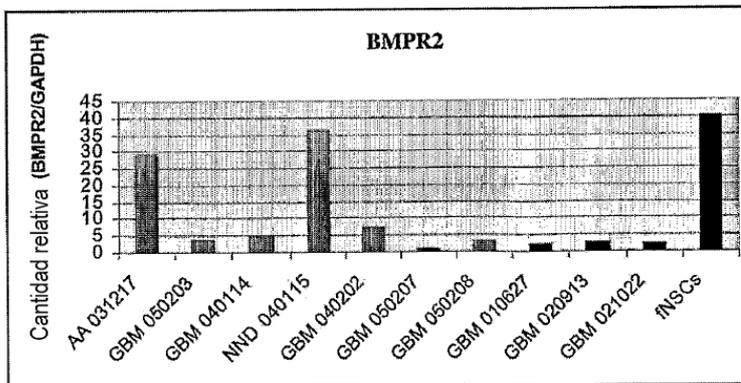
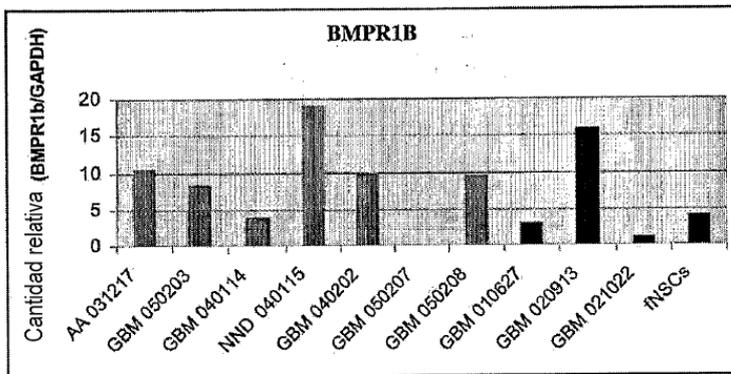
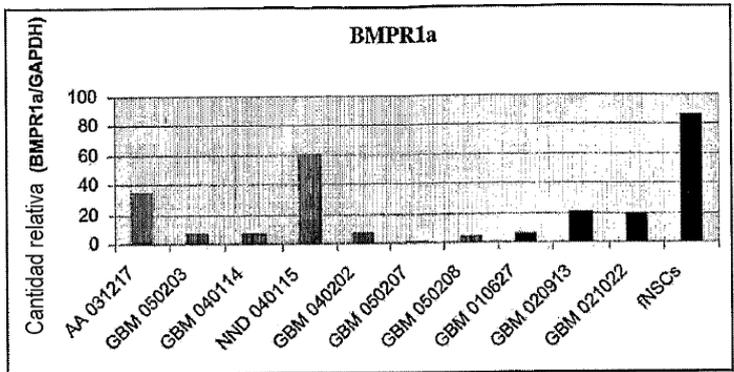


FIGURA 6

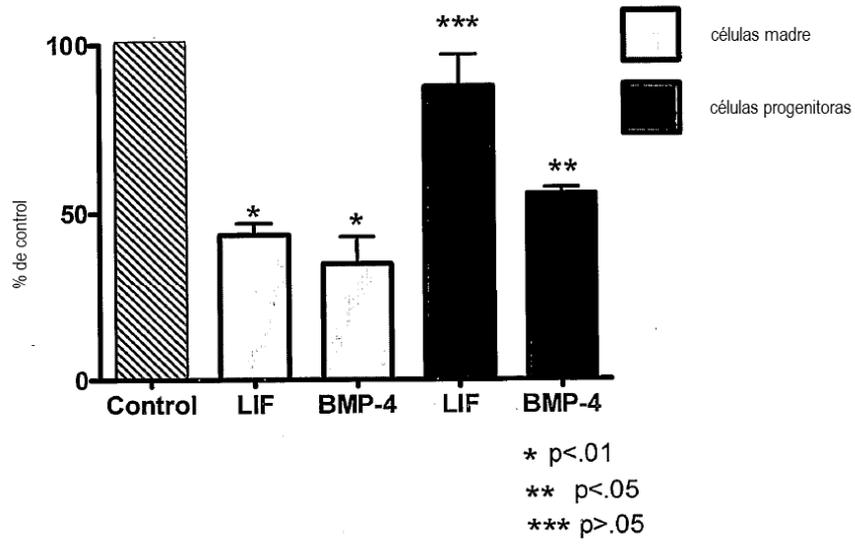


FIGURA 7

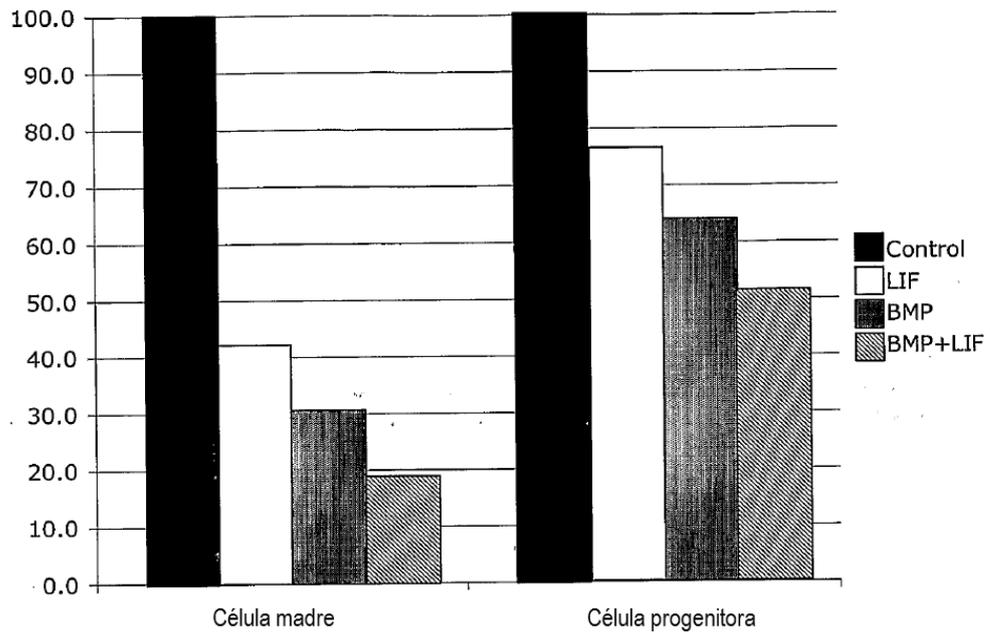


FIGURA 8

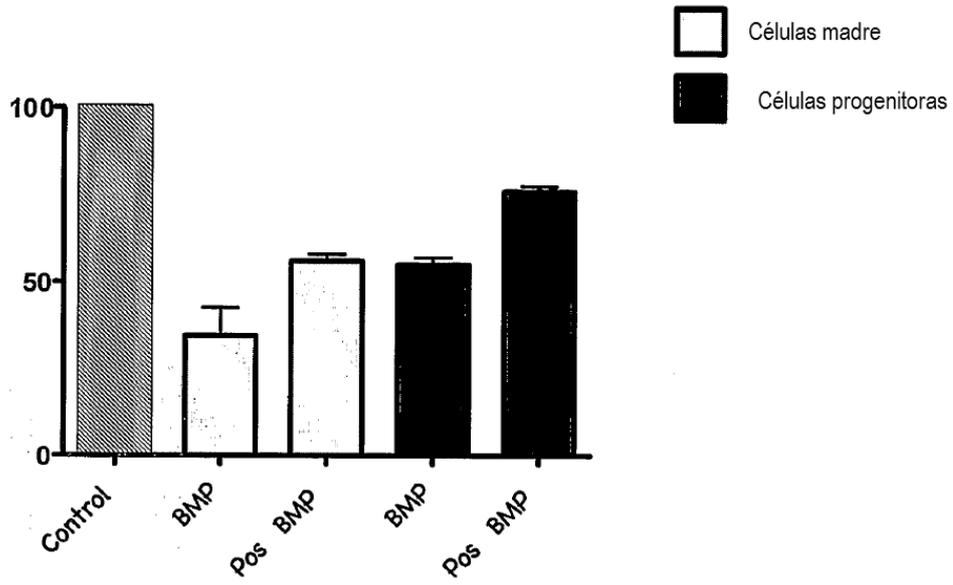


FIGURA 9

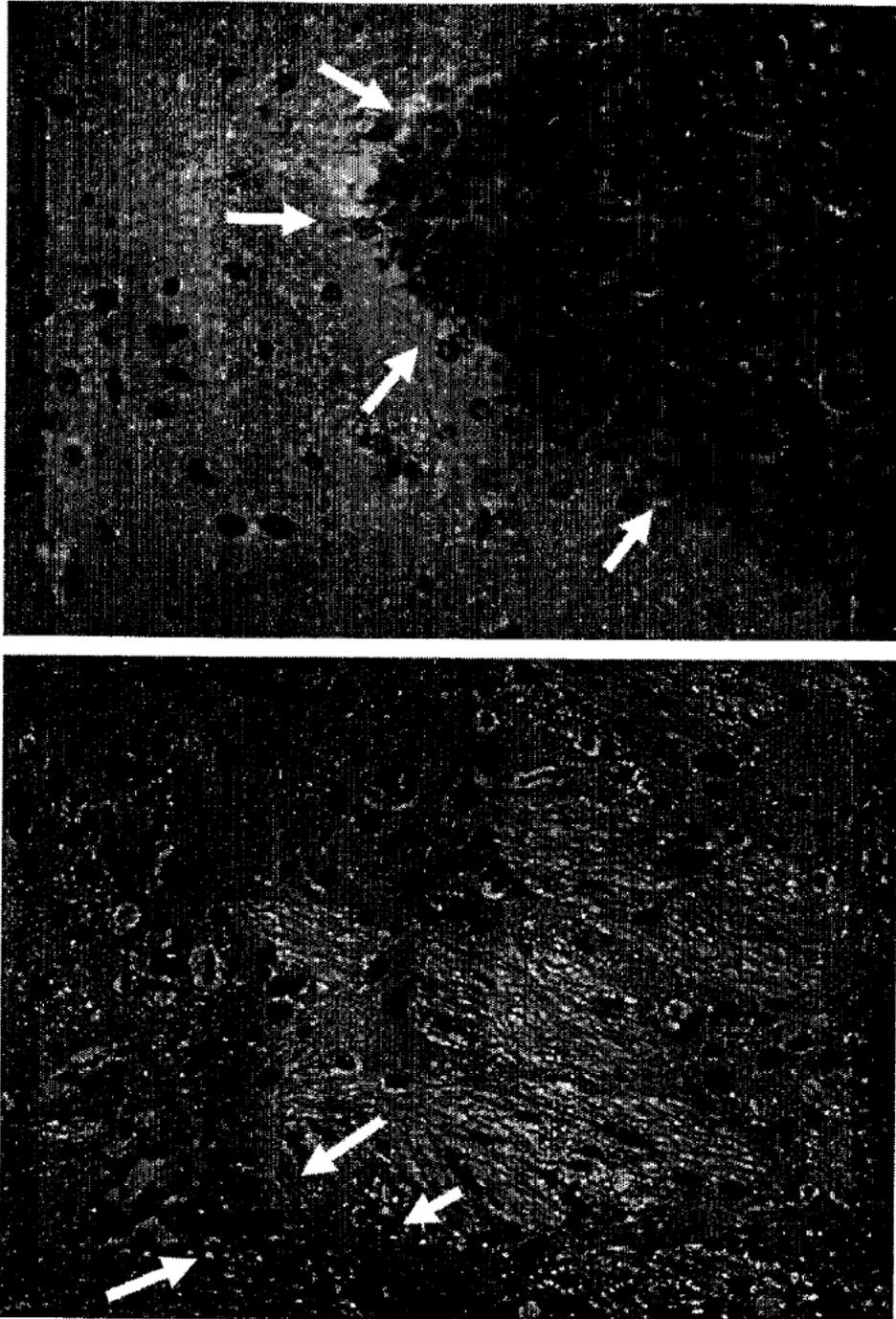


FIGURA 10

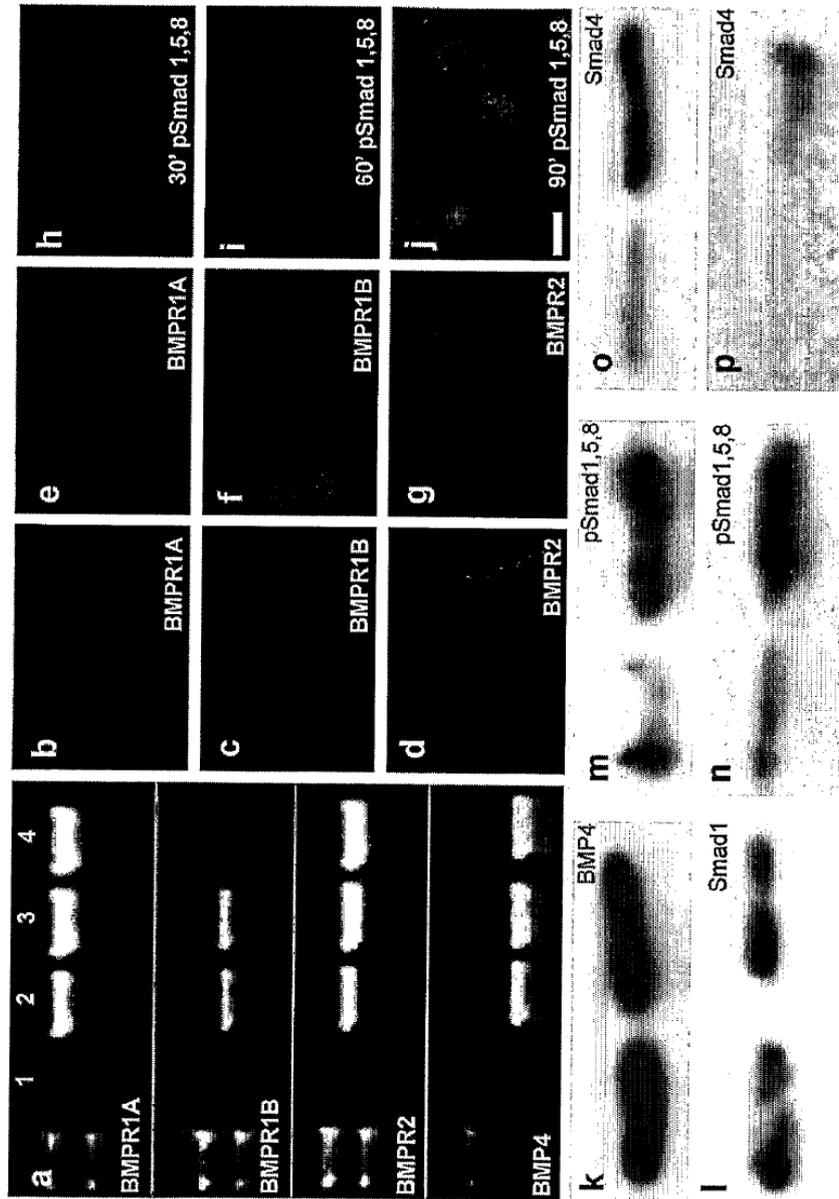


FIGURA 11

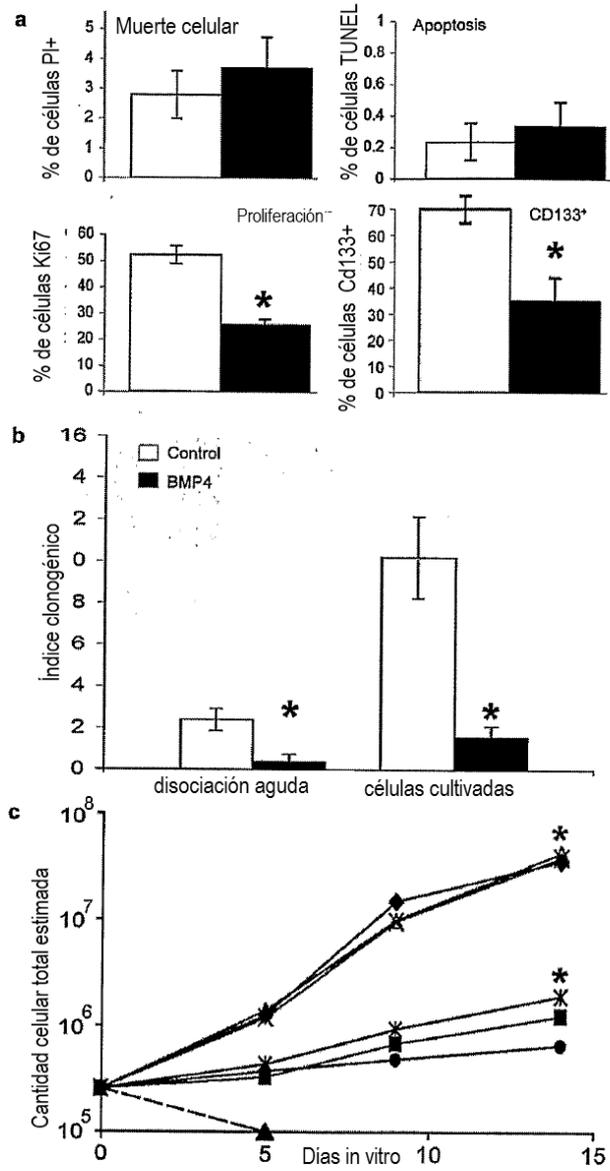


FIGURA 12

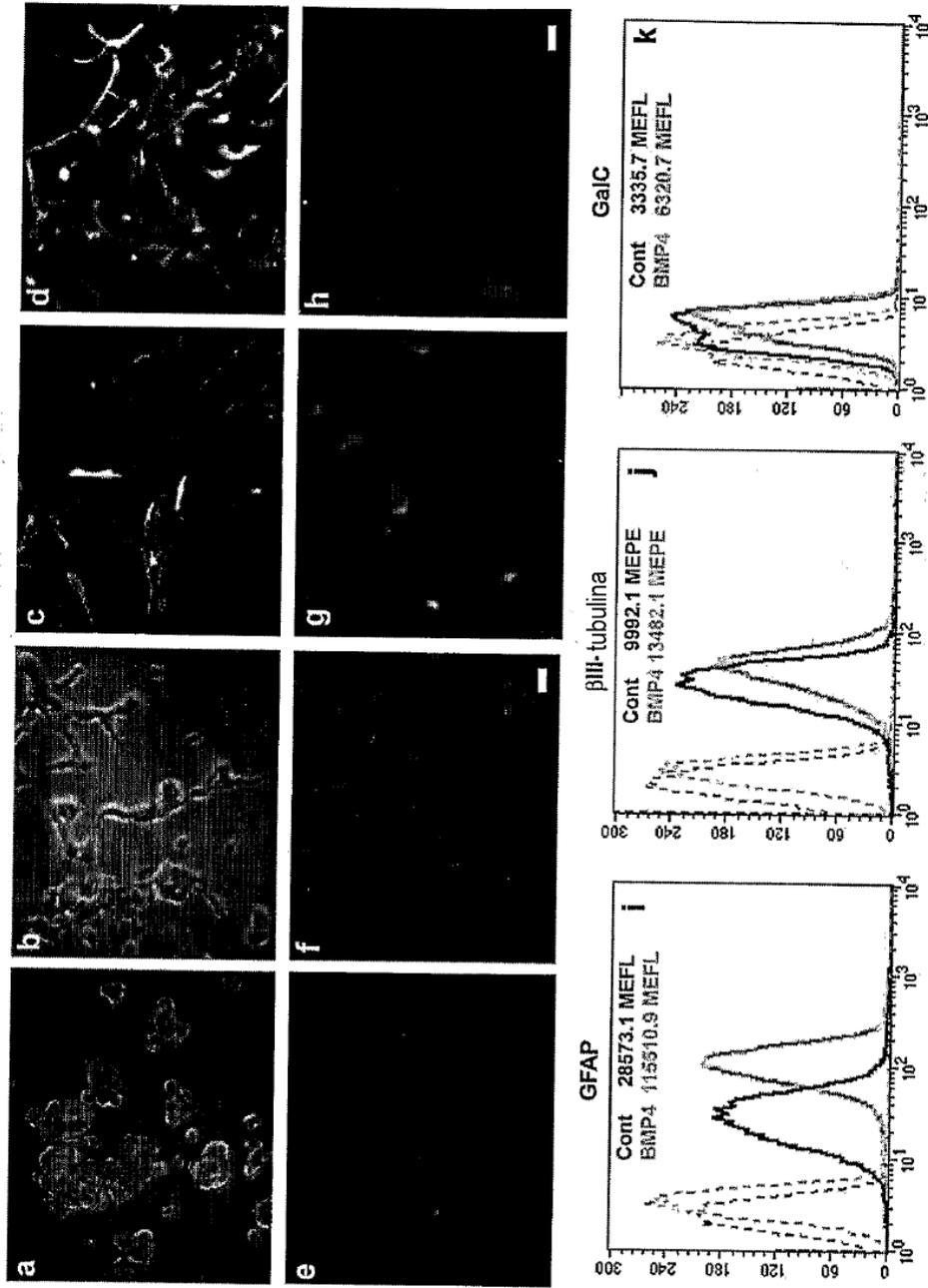


FIGURA 13

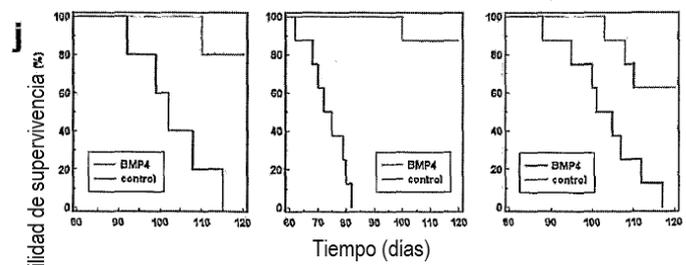
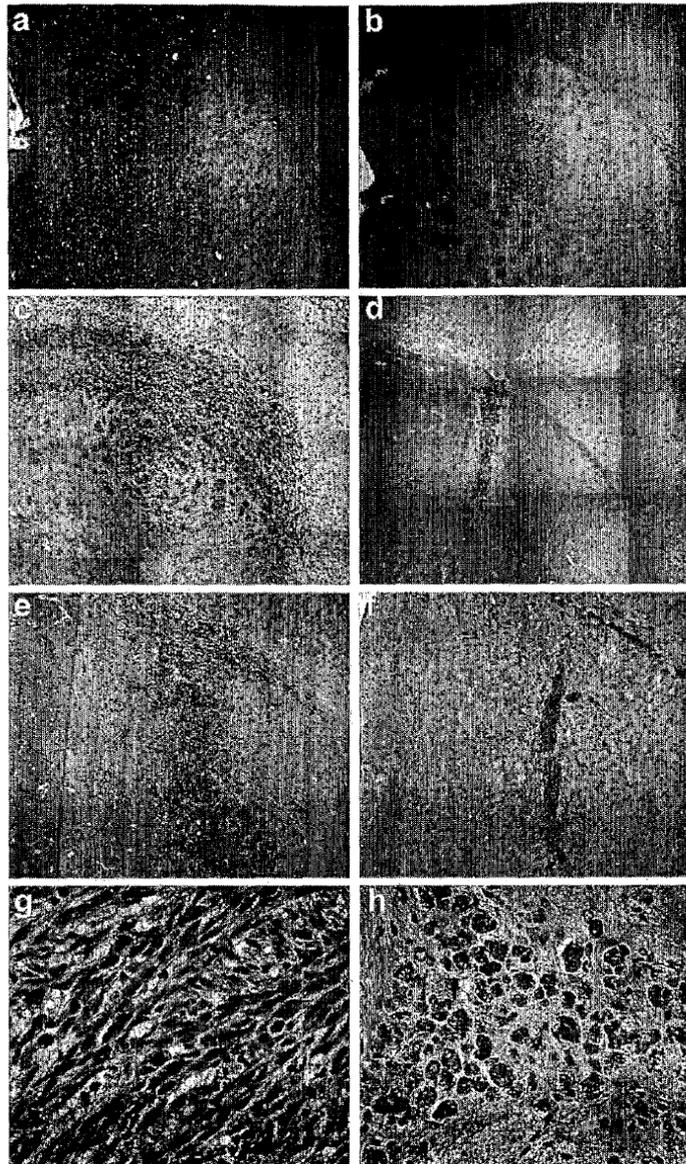


FIGURA 14

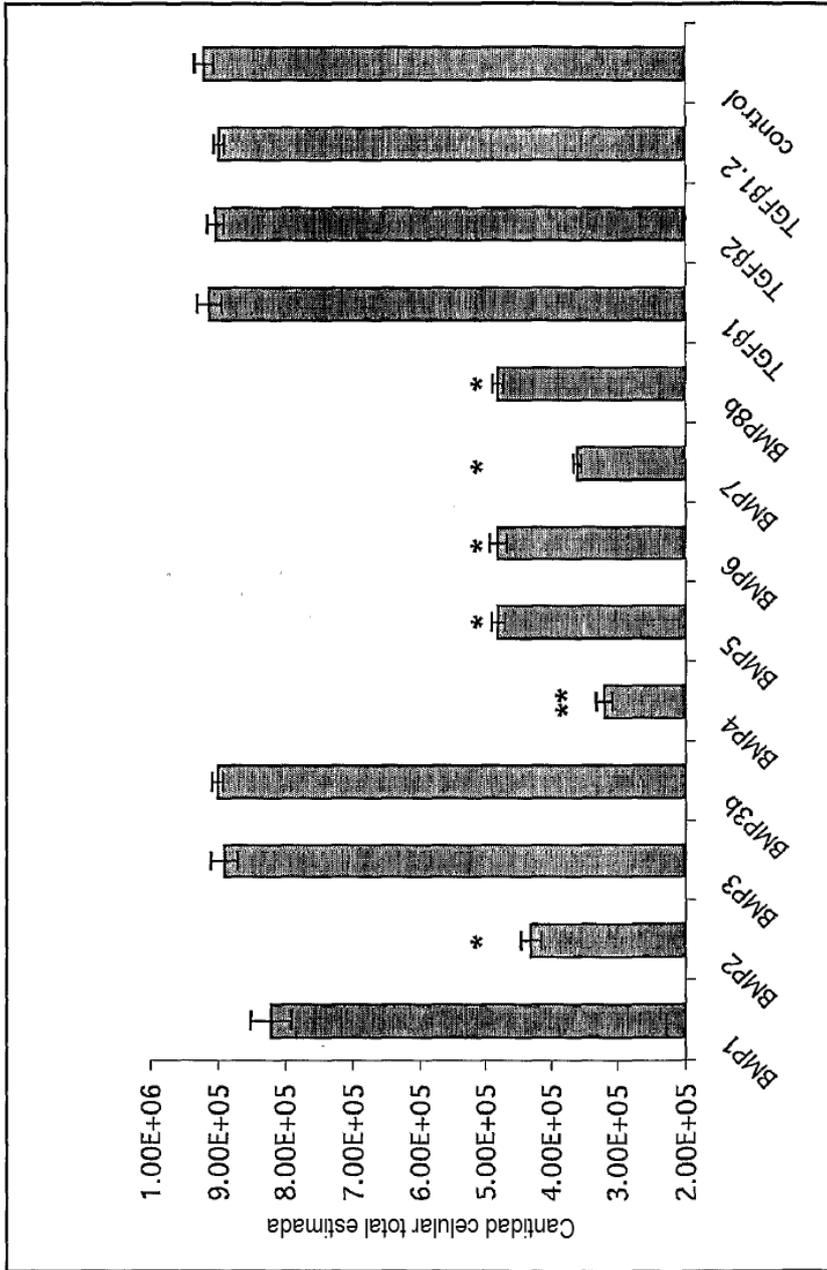


FIGURA 15