

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 042**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/02** (2006.01)

**C12N 5/095** (2010.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2012 PCT/US2012/064000**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070807**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 12847894 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2748329**

54 Título: **Selección como diana de un nicho de células madre de cáncer quiescentes**

30 Prioridad:

**07.11.2011 US 201161556629 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2019**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**JAMIESON, CATRIONA, H.;  
GOFF, DANIEL y  
SMITH, KRISTEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 733 042 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

Selección como diana de un nicho de células madre de cáncer quiescentes

### Campo de la invención

5 Esta divulgación se refiere a biología celular, medicina y oncología. En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos para determinar el potencial de autorrenovación de una célula madre de cáncer (CSC), o para predecir la capacidad farmacológica (susceptibilidad a un fármaco) de una CSC, y/o para predecir la progresión de un cáncer que corresponde a la CSC. En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos para determinar si una CSC en un nicho es más proapoptótica o más antiapoptótica en relación con una célula madre normal o una CSC de otro nicho. En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos para determinar el pronóstico o potencial maligno de un cáncer. En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos que determinan el potencial antiapoptótico frente a proapoptótico de una célula madre de cáncer (CSC).

### Antecedentes de la divulgación

15 Un creciente conjunto de pruebas sugiere que un subconjunto relativamente poco común de células dentro de un cáncer subvierte las propiedades que normalmente se atribuyen a las células madre en los tejidos en regeneración, tales como una mayor autorrenovación y capacidad de supervivencia, lo que hace que estas células madre de cáncer (CSC) sean resistentes a los tratamientos que seleccionan como diana células que se dividen rápidamente (Visvader, J.E. *Nature* 469, 314-322 (2011); Guzmán, M.L., *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16220-16225 (2002)).

20 La leucemia mieloide crónica (CML) avanza desde la fase temprana, crónica (CP) hasta la etapa más avanzada de crisis blástica (BC). Con la progresión hasta la crisis blástica (BC), las células madre de CML se vuelven más resistentes a las terapias que seleccionan como diana BCR-ABL. A medida que la terapia que selecciona como diana BCR-ABL inicia la apoptosis, estos resultados sugieren que CSC de CML pueden volverse cada vez más resistentes a la apoptosis con la progresión. La expresión de la isoforma de la familia de linfoma-2 de células B (Bcl-2 o BCL2) es un factor crítico en la progresión desde CP hasta BC.

25 La familia BCL2 se compone de un conjunto diverso de genes que integran los estímulos prosupervivencia y promueve y modulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Reed, J.C. *Blood* 111, 3322-3330 (2008)). Esta información se revisa en un artículo relacionado con poblaciones de células madre de ciclo lento quiescentes en el cáncer, donde también se menciona BCL-2 (Moore *et al.*, *J Oncology* 9 (6), 400-411 (01.01.2011)). La activación de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial (MOMP) da como resultado la activación de una cascada de caspasa que desencadena la apoptosis. Los genes de la familia BCL2 prosupervivencia contribuyen a la leucemogénesis (Beverly, L.J. y Varmus, H.E. *Oncogene* 28, 1274-1279 (2009)), progresión de CML, resistencia a TKI (Jaiswal, S. *et al.*, citado anteriormente; Sánchez-García, I. & Grutz, G., *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5287-5291 (1995); Horita, M., *et al.* *J Exp Med* 191, 977-984 (2000); Aichberger, K.J., *et al.* *Blood* 105, 3303-3311 (2005); Konopleva, M., *et al.* *Br J Haematol* 118, 521-534 (2002) y la supervivencia de células progenitoras y madre hematopoyéticas (Milyavsky, M., *et al.* *Cell Stem Cell* 7, 186-197 (2010); Domen, J. y Weissman, I.L. *Exp Hematol* 31, 631-639 (2003)) por inhibición directa de MOMP.

35 Los métodos existentes para predecir la progresión de la leucemia y la susceptibilidad a fármacos analizan la mayor parte de las células de una leucemia y no cuantifican las moléculas de la familia BCL2. Sin embargo, no todas las células en una leucemia son equivalentes y CSC en particular presentan una expresión aberrante de moléculas BCL2. Debido a que las CSC impulsan la progresión de la leucemia, el análisis y la caracterización de esa población específicamente podrían permitir una mejor predicción del transcurso de la enfermedad.

40 Las CSC en los nichos de huesos y médula ósea son especialmente resistentes al tratamiento. Esto puede deberse al aumento de la quiescencia (salida del ciclo celular) de CSC en el nicho, así como al aumento de la supervivencia relacionada con las razones aberrantes de isoformas de la familia BCL2.

### Sumario de la invención

45 Específicamente, la invención se refiere a un método para predecir la capacidad farmacológica de una célula madre de leucemia (LSC), comprendiendo el método las siguientes etapas:

(i) detectar y cuantificar en al menos una o una pluralidad de LSC que se ha(n) proporcionado, en la que la pluralidad de LSC es del mismo nicho tumoral:

50 (a) una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas, y/o un transcrito que codifica para una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas, en el que el transcrito de la familia BCL2 se selecciona del grupo que consiste en un transcrito de BCL2, un transcrito de secuencia 1 de leucemia de células mieloides (MCL1), un transcrito de linfoma de células B extra grande (Bcl-XL), o un transcrito de BFI1 o un transcrito de una proteína de la familia BCL2 proapoptótica; y

(b) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la LSC; y

(ii) comparar

5 (a) los niveles cuantificados de proteína o transcrito en la LSC con una célula que tiene un fenotipo de una célula madre normal o una LSC de otro nicho tumoral, o la cantidad de una isoforma de proteína con una segunda isoforma de proteína de la misma proteína, o la cantidad de transcrito que codifica para una isoforma de proteína con la cantidad de transcrito que codifica para una segunda isoforma de proteína de la misma proteína, y

(b) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la LSC con una célula que tiene un fenotipo de una célula madre normal o una LSC de otro nicho tumoral;

en el que la combinación de

10 (a) una cantidad aumentada de quiescencia, o salida del ciclo celular, en la LSC en comparación con una célula que tiene un fenotipo de una célula madre normal o una LSC de otro nicho tumoral, y

15 (b) más cantidad de una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2 y/o más cantidad de una proteína codificada por una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con la cantidad de una proteína codificada por una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2,

indica una susceptibilidad de la LSC a un compuesto inhibidor de la ruta de autorrenovación, o una falta de susceptibilidad de la LSC a un fármaco o un compuesto pro-diferenciación.

En el método de la invención, la etapa de la detección y cuantificación del transcrito comprende preferiblemente el uso de PCR, tal como Q-RT-PCR o equivalente.

20 En una realización preferida del método de la invención, el nicho tumoral es hueso o médula ósea.

En realizaciones alternativas, la divulgación en el presente documento proporciona métodos para determinar el potencial de autorrenovación de una célula madre de cáncer (CSC), o para predecir la capacidad farmacológica (susceptibilidad a un fármaco) de una CSC, y/o para predecir la progresión de un cáncer que corresponde a la CSC, comprendiendo el método:

25 (a) (i) proporcionar al menos una o una pluralidad de CSC, o al menos una o una pluralidad de CSC de un nicho;

(ii) detectar y cuantificar en la al menos una o una pluralidad de CSC:

(1) una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas, y/o, un transcrito (ARNm, mensaje) que codifica para una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas, y

30 (2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC; y

35 (iii) comparar (1) los niveles cuantificados de proteína o transcrito en la CSC con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, o la cantidad de una isoforma de proteína con una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), o la cantidad de transcrito que codifica para una isoforma de proteína con la cantidad de transcrito que codifica para una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), y (2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC comparable con una CSC normal (silvestre) o una CSC de otro nicho; en el que la combinación de

(1) la cantidad aumentada de quiescencia, o la salida del ciclo celular, en la CSC en comparación con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, y

40 (2) más cantidad de una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2, y/o más cantidad de una proteína codificada por una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con la cantidad de una proteína codificada por una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2,

45 indica una susceptibilidad de la CSC a un compuesto inhibidor de la ruta de autorrenovación, o una falta de susceptibilidad de la CSC a un fármaco o un compuesto o fármaco pro-diferenciación, o un peor pronóstico para el cáncer relacionado con la CSC, o progresión de la enfermedad potenciada o aumentada, o supervivencia de CSC aumentada y/o supervivencia de CSC aumentada en respuesta a un tratamiento, dieta o terapia;

(b) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de secuencia 1 de leucemia de células mieloides (MCL1, o MCL1);

50 (c) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de Bcl-XL (o

BCXL, o linfoma de células B extra grande);

(d) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un BF11, o un transcrito de miembro de la familia BCL2 proapoptótico;

5 (e) el método de cualquiera de (a) a (d), en el que la detección y cuantificación del transcrito comprende el uso de PCR;

(f) el método de (e), en el que la PCR comprende una Q-RT-PCR o equivalente;

10 (g) el método de cualquiera de (a) a (e), en el que el método comprende determinar la razón de isoformas de transcritos de la familia BCL2 más largas con respecto a isoformas de transcritos de la familia BCL2 más cortas, en el que la presencia detectada de más de una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más larga con respecto a una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más corta indica una susceptibilidad de la CSC a un compuesto inhibidor de la ruta de autorrenovación, o una falta de susceptibilidad de la CSC a un fármaco o un compuesto o fármaco proliferación, o un peor pronóstico para el cáncer relacionado con la CSC; o

(h) el método de cualquiera de (a) a (g), en el que la célula madre de cáncer (CSC) es una célula madre de leucemia (LSC).

15 En realizaciones alternativas, la divulgación en el presente documento proporciona métodos para determinar si una CSC en un nicho es más proapoptótica o más antiapoptótica en relación con una célula madre normal o una CSC de otro nicho, que comprende:

(a) (i) proporcionar al menos una o una pluralidad de CSC de un nicho;

(ii) detectar y cuantificar en la al menos una o una pluralidad de CSC:

20 (1) una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas, y/o un transcrito (ARNm, mensaje) que codifica para una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas, y

(2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC; y

25 (iii) comparar (1) los niveles cuantificados de proteína o transcrito en la CSC con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, o la cantidad de una isoforma de proteína con una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), o la cantidad de transcrito que codifica para una isoforma de proteína con la cantidad de transcrito que codifica para una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), y (2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC comparable con una CSC normal (silvestre) o una CSC de otro nicho;

en el que la combinación de

30 (1) la cantidad aumentada de quiescencia, o la salida del ciclo celular, en la CSC en comparación con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, y

35 (2) más cantidad de una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2, y/o más cantidad de una proteína codificada por una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con la cantidad de una proteína codificada por una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2,

indica que la CSC en el nicho es más proapoptótica o más antiapoptótica en relación con una célula madre normal o una CSC de otro nicho;

40 (b) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de secuencia 1 de leucemia de células mieloides (MCL1);

(c) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de Bcl-XL (linfoma de células B extra grande);

(d) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un BF11, o un transcrito de miembro de la familia BCL2 proapoptótico;

45 (e) el método de cualquiera de (a) a (d), en el que la detección y cuantificación del transcrito comprende el uso de PCR;

(f) el método de (e), en el que la PCR comprende una Q-RT-PCR o equivalente;

(g) el método de cualquiera de (a) a (e), en el que el método comprende determinar la razón de isoformas de transcritos de la familia BCL2 más largas con respecto a isoformas de transcritos de la familia BCL2 más cortas, en

el que la presencia detectada de más de una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más larga con respecto a una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más corta indica una susceptibilidad de la CSC a un compuesto inhibidor de la ruta de autorrenovación, o una falta de susceptibilidad de la CSC a un fármaco o un compuesto o fármaco pro-diferenciación, o un peor pronóstico para el cáncer relacionado con la CSC; o

- 5 (h) el método de cualquiera de (a) a (g), en el que la célula madre de cáncer (CSC) es una célula madre de leucemia (LSC).

En realizaciones alternativas, la divulgación en el presente documento proporciona métodos para determinar el pronóstico o potencial maligno de un cáncer, que comprende:

(a) (i) proporcionar al menos una o una pluralidad de CSC, o al menos una o una pluralidad de CSC de un nicho;

- 10 (ii) detectar y cuantificar en la al menos una o una pluralidad de CSC:

(1) una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas, y/o un transcrito (ARNm, mensaje) que codifica para una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas, y

(2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC; y

- 15 (iii) comparar (1) los niveles cuantificados de proteína o transcrito en la CSC con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, o la cantidad de una isoforma de proteína con una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), o la cantidad de transcrito que codifica para una isoforma de proteína con la cantidad de transcrito que codifica para una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), y (2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC comparable con una CSC normal (silvestre) o una CSC de otro nicho;

- 20 en el que la combinación de

(1) la cantidad aumentada de quiescencia, o la salida del ciclo celular, en la CSC en comparación con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, y

- 25 (2) más cantidad de una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2, y/o más cantidad de una proteína codificada por una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con la cantidad de una proteína codificada por una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2,

indica un mal o peor pronóstico o potencial maligno aumentado de un cáncer, o un mal o peor pronóstico o potencial maligno aumentado del tumor en el nicho;

- 30 (b) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de secuencia 1 de leucemia de células mieloides (MCL1);

(c) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de Bcl-XL (linfoma de células B extra grande);

- 35 (d) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un BF11, o un transcrito de miembro de la familia BCL2 proapoptótico;

(e) el método de cualquiera de (a) a (d), en el que la detección y cuantificación del transcrito comprende el uso de PCR;

(f) el método de (e), en el que la PCR comprende una Q-RT-PCR o equivalente;

- 40 (g) el método de cualquiera de (a) a (e), en el que el método comprende determinar la razón de isoformas de transcritos de la familia BCL2 más largas con respecto a isoformas de transcritos de la familia BCL2 más cortas, en el que la presencia detectada de más de una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más larga con respecto a una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más corta indica una susceptibilidad de la CSC a un compuesto inhibidor de la ruta de autorrenovación, o una falta de susceptibilidad de la CSC a un fármaco o un compuesto o fármaco pro-diferenciación, o un peor pronóstico para el cáncer relacionado con la CSC; o

- 45 (h) el método de cualquiera de (a) a (g), en el que la célula madre de cáncer (CSC) es una célula madre de leucemia (LSC).

En realizaciones alternativas, la divulgación en el presente documento proporciona métodos para determinar el potencial antiapoptótico frente a proapoptótico de una célula madre de cáncer (CSC), comprendiendo el método:

(a) (i) proporcionar al menos una o una pluralidad de CSC, o al menos una o una pluralidad de CSC de un nicho;

(ii) detectar y cuantificar en la al menos una o una pluralidad de CSC:

(1) una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas, y/o un transcrito (ARNm, mensaje) que codifica para una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas, y

(2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC; y

5 (iii) comparar (1) los niveles cuantificados de proteína o transcrito en la CSC con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, o la cantidad de una isoforma de proteína con una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), o la cantidad de transcrito que codifica para una isoforma de proteína con la cantidad de transcrito que codifica para una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), y (2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC comparable con una  
10 CSC normal (silvestre) o una CSC de otro nicho;

en el que la combinación de

(1) la cantidad aumentada de quiescencia, o la salida del ciclo celular, en la CSC en comparación con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, y

15 (2) más cantidad de una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2, y/o más cantidad de una proteína codificada por una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con la cantidad de una proteína codificada por una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2,

20 indica un potencial proapoptótico de una célula madre de cáncer (CSC), o un potencial proapoptótico de una célula madre de cáncer (CSC) en el nicho;

(b) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de secuencia 1 de leucemia de células mieloides (MCL1);

(c) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de Bcl-XL (linfoma de células B extra grande);

25 (d) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un BF11, o un transcrito de miembro de la familia BCL2 proapoptótico;

(e) el método de cualquiera de (a) a (d), en el que la detección y cuantificación del transcrito comprende el uso de PCR;

(f) el método de (e), en el que la PCR comprende una Q-RT-PCR o equivalente;

30 (g) el método de cualquiera de (a) a (e), en el que el método comprende determinar la razón de isoformas de transcritos de la familia BCL2 más largas con respecto a isoformas de transcritos de la familia BCL2 más cortas, en el que la presencia detectada de más de una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más larga con respecto a una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más corta indica una susceptibilidad de la CSC a un compuesto inhibidor de la ruta de autorrenovación, o una falta de susceptibilidad de la CSC a un fármaco o un compuesto o fármaco  
35 proliferación, o un peor pronóstico para el cáncer relacionado con la CSC; o

(h) el método de cualquiera de (a) a (g), en el que la célula madre de cáncer (CSC) es una célula madre de leucemia (LSC).

En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto con una célula madre de cáncer (CSC) quiescente en un nicho que comprende:

40 (a) (i) proporcionar una muestra del sujeto de al menos una o una pluralidad de CSC de un nicho;

(ii) detectar y cuantificar en la al menos una o una pluralidad de CSC:

(1) una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas, y/o un transcrito (ARNm, mensaje) que codifica para una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas, y

(2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC; y

45 (iii) comparar (1) los niveles cuantificados de proteína o transcrito en la CSC con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, o la cantidad de una isoforma de proteína con una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), o la cantidad de transcrito que codifica para una isoforma de proteína con la cantidad de transcrito que codifica para una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), y (2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC comparable con una  
50 CSC normal (silvestre) o una CSC de otro nicho;

en el que la combinación de

(1) la cantidad aumentada de quiescencia, o la salida del ciclo celular, en la CSC en comparación con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, y

5 (2) más cantidad de una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2, y/o más cantidad de una proteína codificada por una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con la cantidad de una proteína codificada por una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2,

indica que el sujeto debe tratarse con uno o más agentes quimioterápicos;

10 (b) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de secuencia 1 de leucemia de células mieloides (MCL1, o MCL1);

(c) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de Bcl-XL (o BCXL, o linfoma de células B extra grande);

15 (d) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un BF11, o un transcrito de miembro de la familia BCL2 proapoptótico;

(e) el método de cualquiera de (a) a (d), en el que la detección y cuantificación del transcrito comprende el uso de PCR;

(f) el método de (e), en el que la PCR comprende una Q-RT-PCR o equivalente;

20 (g) el método de cualquiera de (a) a (e), en el que el método comprende determinar la razón de isoformas de transcritos de la familia BCL2 más largas con respecto a isoformas de transcritos de la familia BCL2 más cortas, en el que la presencia detectada de más de una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más larga con respecto a una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más corta indica una susceptibilidad de la CSC a un compuesto quimioterápico de la ruta de autorrenovación; o

25 (h) el método de cualquiera de (a) a (g), en el que la célula madre de cáncer (CSC) es una célula madre de leucemia (LSC). En realizaciones alternativas del método, el sujeto se trata con uno o más inhibidores de pan-BCL2. En todavía otras realizaciones el sujeto se trata con agentes quimioterápicos adicionales.

En realizaciones alternativas, se da a conocer en el presente documento un método para determinar si un sujeto debe incluirse en un ensayo clínico que comprende:

(a) (i) proporcionar una muestra del sujeto de al menos una o una pluralidad de CSC de un nicho;

30 (ii) detectar y cuantificar en la al menos una o una pluralidad de CSC:

(1) una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas, y/o un transcrito (ARNm, mensaje) que codifica para una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas, y

(2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC; y

35 (iii) comparar (1) los niveles cuantificados de proteína o transcrito en la CSC con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, o la cantidad de una isoforma de proteína con una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), o la cantidad de transcrito que codifica para una isoforma de proteína con la cantidad de transcrito que codifica para una segunda isoforma de proteína (de la misma proteína), y (2) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la CSC comparable con una CSC normal (silvestre) o una CSC de otro nicho;

40 en el que la combinación de

(1) la cantidad aumentada de quiescencia, o la salida del ciclo celular, en la CSC en comparación con una célula que tiene un fenotipo normal comparable (silvestre) o una CSC de otro nicho, y

45 (2) más cantidad de una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2, y/o más cantidad de una proteína codificada por una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con la cantidad de una proteína codificada por una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2,

indica que el sujeto debe incluirse en un ensayo clínico;

(b) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de secuencia 1

de leucemia de células mieloides (MCL1 o MCL1);

(c) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un transcrito de Bcl-XL (o BCXL, o linfoma de células B extra grande);

5 (d) el método de (a), en el que el transcrito de la familia BCL2 comprende o consiste en un BFL1, o un transcrito de miembro de la familia BCL2 proapoptótico;

(e) el método de cualquiera de (a) a (d), en el que la detección y cuantificación del transcrito comprende el uso de PCR;

(f) el método de (e), en el que la PCR comprende una Q-RT-PCR o equivalente;

10 (g) el método de cualquiera de (a) a (e), en el que el método comprende determinar la razón de isoformas de transcritos de la familia BCL2 más largas con respecto a isoformas de transcritos de la familia BCL2 más cortas,

en el que la presencia detectada de más de una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más larga con respecto a una isoforma de transcrito de la familia BCL2 más corta indica una susceptibilidad de la CSC a un compuesto quimioterápico de la ruta de autorrenovación; o

15 (h) el método de cualquiera de (a) a (g), en el que la célula madre de cáncer (CSC) es una célula madre de leucemia (LSC).

En realizaciones alternativas, se dan a conocer en el presente documento métodos para sensibilizar una célula madre de cáncer quiescente en un nicho que comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento un compuesto que estimula el ciclado de una célula madre de cáncer durmiente, lo que da como resultado la sensibilización de las células madres de cáncer a un agente quimioterápico. En otros aspectos de esta realización, el compuesto que estimula el ciclado es un inhibidor de una ruta implicada en la quiescencia de una célula madre de cáncer. En todavía otras realizaciones, la ruta implicada en la quiescencia es una ruta implicada en la apoptosis. En realizaciones alternativas la ruta implica isoformas de BCL2. En realizaciones alternativas, el compuesto que estimula el ciclado es uno o más inhibidores de pan-BCL2. En todavía otras realizaciones de este método, se sensibilizan células madre de cáncer con un inhibidor de tirosina cinasa, tal como una tirosina cinasa que inhibe BCR-ABL.

Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación.

### Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1. Método para analizar el ciclo celular de LSC de nichos tumorales. (A) Diseño experimental. (B) Estrategia de separación para el análisis del ciclo celular de células de leucemia mieloide crónica con crisis blástica injertadas en médula ósea (CML en BC); (C) diseño experimental *in vivo*. Se trasplantan células CD34<sup>+</sup> de CML en BC en ratones recién nacidos. Los ratones injertados se trataron diariamente con 25 mg/kg de dasatinib (oral) o vehículo, se sacrificaron después de 2 semanas de tratamiento y se analizó la médula ósea para determinar el estado del ciclo celular. (D) Análisis del ciclo celular de células CML en BC injertadas en médula ósea usando Ki-67 y 7-AAD para diferenciar entre células GO, G1, S y G2/M. Se cuantificaron células CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> para cada subgrupo en la médula de los ratones tratados con vehículo (n = 5) y con dasatinib (n = 4). El gráfico muestra la media +/- EEM. (E) Gráficos representativos de citometría de flujo de CSC de CML en BC en la médula ósea de ratones tratados con vehículo (izquierda) y con dasatinib (derecha).

40 Figura 2. qRT-PCR de ARNm de BCL2, MCL1, BCLX y BFL1 prosupervivencia (isoformas largas) en células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> (progenitoras) clasificadas por FACS a partir de muestras de CP CML (negro, n = 13) y CML en BC (gris, n = 11) primarias. Los valores se normalizan a la expresión de ARNm de HPRT humano. Los gráficos muestran la media +/- EEM; \* p < 0,05 mediante prueba de la t desapareada.

45 Figura 3 (a). Análisis de FACS del injerto de progenitoras de BC humanas en hígado de ratón (n = 11), bazo (n = 11), sangre (n = 4) y médula ósea (n = 12) después del tratamiento con vehículo (negro) o dasatinib (gris). Todos los valores están normalizados a la media del vehículo. El análisis estadístico se muestra para el injerto residual en la médula ósea frente a los otros tejidos (barras grises) mediante la prueba de Kruskal-Wallis con análisis a posteriori; \* p < 0,05. (b) Análisis de FACS que compara el injerto en médula ósea de las progenitoras de CML en BC y las no progenitoras (CD45<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>) después del tratamiento con vehículo (negro, n = 11) o dasatinib (gris, n = 11). Todos los valores están normalizados a los tratados con vehículo. El análisis estadístico se muestra para el injerto residual de cada población (barras grises) mediante la prueba de Mann Whitney; \* p < 0,05.

50 Figura 4 (a). Datos de la matriz de qRT-PCR de la familia BCL2 de progenitoras clasificadas por FACS de ratones injertados (n = 3). El gráfico representa la expresión en veces en las progenitoras injertadas en médula en relación con las progenitoras injertadas en bazo, que se establecen en 1. (b) Expresión de isoformas de ARNm de BCL2L y expresión de proteína BCL2 en progenitoras de BC injertadas en médula frente a bazo, (c) análisis

inmunohistoquímico representativo de injerto macroscópico (superior) y endóstico (inferior) de células CD34<sup>+</sup>, BCL2<sup>+</sup> y MCL1<sup>+</sup> humanas en médula ósea de ratón. Las barras de escala equivalen a 1 mm en imágenes de bajo aumento y 100 μm en imágenes de alto aumento, (d) imágenes representativas que muestran el análisis de inmunofluorescencia de células hCD38<sup>+</sup> y hBCL2<sup>+</sup> en la médula injertada con CML en BC en comparación con la médula de control sin trasplante. Todas las barras de escala equivalen a 50 μm. El área encuadrada muestra un primer plano de la región endóstica.

Figura 5 (a). Diseño experimental *in vivo* usado en los presentes estudios, (b) análisis de FACS del injerto de progenitoras de CML en BC en hígado, bazo, sangre y médula ósea de ratón después del tratamiento con vehículo (n = 15) o sabutoclastax (n = 13). Todos los valores están normalizados a la media del vehículo, (c) análisis de FACS de progenitoras injertadas en médula ósea después del tratamiento con vehículo o sabutoclastax: izquierda) injerto de progenitoras normales en ratones tratados con vehículo (n = 6) y sabutoclastax (n = 6). Derecha) injerto de progenitoras de CML en BC en ratones tratados con vehículo (n = 15) y sabutoclastax (n = 13). Los ratones individuales están codificados por colores para indicar el origen de cada trasplante de CML en BC. Todos los valores están normalizados a los tratados con vehículo. Ambos gráficos muestran la mediana y el análisis estadístico mediante la prueba de Mann Whitney.

Figura 6. qRT-PCR de ARNm de MCL1 prosupervivencia (isoformas largas) y proapoptóticos (isoformas cortas) en células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>Pl<sup>-</sup> (progenitoras) clasificadas por FACS de muestras de sangre de cordón umbilical humano normal (n = 10), CML en CP primarias (n = 8) y CML en BC (n = 8) primarias. Los valores se normalizan a la expresión de ARNm de HPRT humano.

Figura 7. Análisis del ciclo celular de células de CML en BC injertadas en médula ósea usando Ki-67 y 7-AAD para diferenciar entre células G0, G1 y G2/S. Se cuantificaron células CD45<sup>+</sup> para cada subgrupo en la médula de ratones tratados con vehículo (n = 6) y con sabutoclastax (n = 5). El gráfico muestra la media +/- EEM. \* p <0,05 mediante prueba de la t desapareada.

Figura 8. Sabutoclastax sensibiliza a LSC de BC al tratamiento con dasatinib *in vivo*, (a) injerto relativo de progenitoras de BC en médula después del tratamiento con vehículo (n = 2), sabutoclastax (2,5 mg, n = 2), dasatinib (50 mg/kg, n = 3) y sabutoclastax en combinación con dasatinib (n = 2). El análisis estadístico es mediante prueba de la t desapareada. b) Supervivencia de ratones después de un trasplante en serie con vehículo (n = 5), sabutoclastax (n = 5), dasatinib (n = 3) y médula tratada con la combinación (n = 4). El análisis estadístico es mediante la prueba de rangos logarítmicos, c) cuantificación de la tinción con BCL2, MCL1 y Ki67 en células CD34<sup>+</sup> injertadas en epífisis y diáfisis (d) después del tratamiento con dasatinib (n = 3) frente a dasatinib en combinación con sabutoclastax (n = 3). Todos los gráficos de barras en la figura 8 muestran la media +/- EEM.

### Descripción detallada de las realizaciones

Se dan a conocer en el presente documento métodos para identificar y tratar a sujetos con células madre de cáncer quiescentes seleccionando como diana nichos de células madre de cáncer, tales como médula ósea, en los que si se determina que un sujeto tiene una célula madre de cáncer quiescente específica de nicho tal como se da a conocer en el presente documento, el paciente se trata y/o se incluye en un ensayo clínico. Los métodos dados a conocer en el presente documento se basan en los estudios dados a conocer en el presente documento que muestran que la expresión de isoformas de genes de la familia BCL2 prosupervivencia dependientes de nicho promueve la reprogramación maligna de progenitoras mieloides a células madre de cáncer en crisis blástica (BC) que se autorrenuevan que se vuelven quiescentes en el nicho de la médula y contribuyen a la transformación de BC así como a la resistencia a inhibidores de tirosina cinasa (TKI). Los métodos dados a conocer en el presente documento son aplicables a cualquier cáncer asociado con células madre de cáncer quiescentes encontradas en un nicho tal como médula y asociadas con la expresión de isoformas prosupervivencia de BCL2, tales como, sin limitación, neoplasia mieloproliferativa, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloides aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), crisis blástica de leucemia mieloides crónica, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difuso, sarcoma de Ewing, linfoma folicular, tumor estromal gastrointestinal, carcinoma hepatocelular, linfoma de células del manto, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, carcinoma de pulmón de células pequeñas, leucemia/linfoma de células T, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de próstata.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, normalmente un ser humano (es decir, un hombre o una mujer de cualquier grupo de edad, por ejemplo, un paciente pediátrico (por ejemplo, lactante, niño, adolescente) o paciente adulto (por ejemplo, adulto joven, adulto de mediana edad o adulto mayor)) u otro mamífero, tal como un primate (por ejemplo, mono cynomolgus, mono rhesus); otros mamíferos tales como roedores (ratones, ratas), ganado, cerdos, caballos, ovejas, cabras, gatos, perros; y/o aves, que serán o han sido objeto de tratamiento, observación y/o experimento. Cuando el término se usa conjuntamente con la administración de un agente, composición, compuesto o fármaco, entonces el paciente ha sido el objeto del tratamiento, observación y/o administración de la composición, compuesto o fármaco.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "composiciones", "fármaco", "agente", "compuesto" y "agente terapéutico" se usan de manera intercambiable, y pueden incluir, sin limitación, compuestos de molécula

pequeña, agentes biológicos (por ejemplo, anticuerpos, proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de fusión, glicoproteínas, etc.), agentes de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas antisentido, de iARN/ARNip y microARN, etc.), vacunas, etc., que pueden usarse para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de una enfermedad (por ejemplo, tumor maligno).

- 5 Un “agente quimioterápico” es un compuesto útil en el tratamiento de cáncer independientemente del mecanismo de acción. Los agentes quimioterápicos incluyen compuestos usados en “terapia dirigida” y quimioterapia convencional.

Los agentes quimioterápicos útiles para los métodos dados a conocer en el presente documento incluyen, sin limitación, inhibidores de pan-BCL2 tales como, sin limitación, ABT-737, ABT-263, EGCG, AT-101, BI79D10, sabutoclax (BI-97C1), apogosispolona, “compuesto 21”, S1, B-11, TW-37, gosipol, apogosispol, A-385358, obatoclax (G15-070), BH3I-1, HA14-1, WL-276, YC137, antimicina A, queleritrina, maritoclax (marinopirrol), BH3-M6 y combinaciones de los mismos.

Otros agentes quimioterápicos útiles para la invención dados a conocer en el presente documento incluyen dasatinib, imatinib, bafetinib, bosutinib, nilotinib y AP24534.

Los ejemplos de agentes quimioterápicos adicionales que pueden ser útiles para tratar a un sujeto que se encuentra que tiene una célula madre de cáncer específica de nicho quiescente tal como se describe en el presente documento incluyen erlotinib (TARCEVA<sup>®</sup>, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE<sup>®</sup>, Millennium Pharm.), fulvestrant (FASLODEX<sup>®</sup>, AstraZeneca), Sutent (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA<sup>®</sup>, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin<sup>®</sup>, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (sirolimús, RAPAMUNE<sup>®</sup>, Wyeth), lapatinib (TYKERB<sup>®</sup>, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs), irinotecán (CAMPTOSAR<sup>®</sup>, Pfizer) y gefitinib (IRESSA<sup>®</sup>, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 527; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN<sup>®</sup> ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcoditiina; espongiatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, bendamustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteínas relacionadas), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN<sup>®</sup> (doxorubicina), morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano, testolactona; agentes anti-suprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedores de ácido fólico tales como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; elformitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoxazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de sacáridos PS K<sup>®</sup>poly (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazouona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL<sup>®</sup> (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE<sup>™</sup> (libre de Cremophor), formulaciones de nanopartículas modificadas por ingeniería genética con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, 111), y TAXOTERE<sup>®</sup> (doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; GEMZAR<sup>®</sup> (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE<sup>®</sup> (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA<sup>®</sup>); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de “agente quimioterápico”: (i) agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX<sup>®</sup>; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON<sup>®</sup> (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromataza que inhiben la enzima aromataza, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE<sup>®</sup> (acetato de megestrol), AROMASIN<sup>®</sup> (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR<sup>®</sup> (vorozol), FEMARA<sup>®</sup> (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX<sup>®</sup> (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de proteína cinasa; (v) inhibidores de lípido cinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME<sup>®</sup>) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN<sup>®</sup>, LEUVECTIN<sup>®</sup> y VAXID<sup>®</sup>; PROLEUKIN<sup>®</sup> rIL-2; un inhibidor de topoisomerasa 1 tal como LURTOTECAN<sup>®</sup>; ABARELIX<sup>®</sup> rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN<sup>®</sup>, Genentech); y (x) sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de “agente quimioterápico” anticuerpos terapéuticos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN<sup>®</sup>, Genentech); cetuximab (ERBITUX<sup>®</sup>, Imclone); panitumumab (VECTIBIX<sup>®</sup>, Amgen), rituximab (RITUXAN<sup>®</sup>, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG<sup>®</sup>, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN<sup>®</sup>, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia) y el conjugado de anticuerpo-farmaco, gemtuzumab ozogamicina (MILOTARG<sup>®</sup>, Wyeth).

Los anticuerpos monoclonales humanizados con potencial terapéutico como agentes quimioterápicos incluyen: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pertuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab, tucotuzumab celmoleucina, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab y visilizumab.

Los agentes quimioterápicos enumerados en el presente documento pueden administrarse en combinación entre sí así como en combinación con tratamientos de radiación y agentes anticancerígenos marcados radiactivamente.

Los esteroides usados solos o en combinación con un régimen contra el cáncer clínicamente empleado también se consideran fármacos que pueden usarse solos o combinados con los agentes quimioterápicos enumerados en el presente documento.

La divulgación en este documento proporciona composiciones y métodos para determinar el potencial de autorrenovación de las células madre de cáncer (CSC) a través del análisis de tanto la expresión diferencial de moléculas de la familia BCL2, tales como las formas sometidas a corte y empalme alternativo de las moléculas de la familia BCL2, como el estado del ciclo celular de una CSC. En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos que comparan tanto el estado del ciclo celular como la expresión diferencial de moléculas de la familia BCL2, tales como formas sometidas a corte y empalme alternativo de las moléculas de la familia BCL2 para determinar si la CSC en los nichos de hueso y médula ósea son susceptibles o resistentes o no al tratamiento. En una realización, la detección de un aumento de la quiescencia (salida del ciclo celular) de CSC en el nicho en combinación con razones aberrantes de isoformas de la familia BCL2, por ejemplo, isoformas largas de miembros de la familia BCL2 tales como MCL1, BCLX y BFI1, están asociadas con progresión de la enfermedad, aumento de la supervivencia de CSC y/o aumento de la supervivencia de CSC en respuesta a un tratamiento, dieta o terapia y similares.

Un “nicho” para una célula madre de cáncer es el microentorno que controla, por ejemplo, las propiedades de la célula madre de cáncer, tales como, sin limitación, autorrenovación, resistencia a la apoptosis y diferenciación. El nicho también puede proporcionar protección a las células madre de cáncer y contribuir a su resistencia a la terapia. Los ejemplos de nichos para células madre de cáncer incluyen, sin limitación, médula ósea y cripta intestinal para el cáncer de colon. Una discusión sobre los nichos de células madre de cáncer puede encontrarse en Lander *et al.* BMC Biology (2012), 10-19 y Melo *et al.*, Cancer Research (2011) 71: 634-639.

En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos para la caracterización tanto del estado del ciclo celular como de la expresión diferencial de moléculas de la familia BCL2 tanto en CSC en nichos tumorales específicos como en células madre normales. En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos para la caracterización de tanto el estado del ciclo celular como la expresión diferencial de las moléculas de la familia BCL2 tanto en los CSC en nichos tumorales específicos como en células madre normales a lo largo del transcurso

del tratamiento para, por ejemplo, permitir la predicción de la susceptibilidad a fármacos de las CSC, la determinación del pronóstico y la progresión del cáncer y la monitorización de la respuesta de CSC a productos terapéuticos contra el cáncer.

5 En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos para caracterizar células madre de cáncer (CSC) dentro de un nicho tumoral, por ejemplo, un nicho de médula ósea, y para pronosticar y determinar la respuesta de células madre de cáncer (CSC) a terapias, tratamientos, dietas y similares contra el cáncer. En realizaciones alternativas, los métodos dados a conocer en el presente documento comprenden determinar el estado del ciclo celular de CSC en un nicho tumoral, cuantificar (cuantificación) las razones de población de moléculas de la familia BCL2, por ejemplo, razones de isoformas de corte y empalme de ARNm de la familia BCL2 (por ejemplo, en las isoformas MCL1, BCLX y BFI1), en la población de CSC; y usar ambos como marcador “colectivo” de la supervivencia celular dentro de nichos tumorales. En realizaciones alternativas, los métodos dados a conocer en el presente documento comprenden comparar (comparación) del estado del ciclo celular de CSC y las razones de isoformas de ARNm de BCL2 entre CSC y células madre normales, y dentro de CSC durante el transcurso del tratamiento, la terapia, la dieta y similares. En realizaciones alternativas, los métodos dados a conocer en el presente documento comprenden predecir (predicción) de la susceptibilidad al fármaco de tratamiento para CSC, la determinación del pronóstico del cáncer y la progresión y monitorización de la respuesta de CSC a productos terapéuticos, tratamientos, dietas y similares contra el cáncer.

20 En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona métodos para predecir la progresión del cáncer, la susceptibilidad al fármaco y la respuesta del cáncer a un tratamiento, dieta o terapia mediante el análisis de: tanto (1) la expresión diferencial de moléculas de la familia BCL2, tales como formas sometidas a corte y empalme alternativo de las moléculas de la familia BCL2, como (2) el estado del ciclo celular de CSC del cáncer. Por lo tanto, los métodos divulgados en el presente documento tienen en cuenta la heterogeneidad de la mayoría de los tumores: examinando específicamente la CSC, que impulsa la progresión y la recidiva del cáncer; y examinando los efectos del estado del ciclo celular dentro de un nicho tumoral sobre la supervivencia de la CSC y la respuesta a un tratamiento, dieta o terapia y similares.

30 En realizaciones alternativas, los métodos divulgados en el presente documento comprenden el uso de citometría de flujo, ensayos de amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa o PCR; o qPCR, o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, también llamada reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR) o reacción en cadena de la polimerasa cinética (KPCR)), técnicas de inmunocitoquímica, cromatografía (por ejemplo, HPLC) y similares para caracterizar el estado de moléculas de la familia BCL2, incluyendo poblaciones de ARNm cortados y empalmados, la expresión de proteínas de estas poblaciones de ARNm cortados y empalmados y el estado del ciclo celular. En realizaciones alternativas, los métodos dados a conocer en el presente documento examinan la población de CSC específicamente. En realizaciones alternativas, los métodos dados a conocer en el presente documento distinguen entre diferentes nichos tumorales. En realizaciones alternativas, los métodos dados a conocer en el presente documento cuantifican el estado del ciclo celular y la expresión de ARNm de isoformas de miembros de la familia BCL2 en CSC, incluyendo CSC de diferentes nichos tumorales.

40 En una realización, la caracterización de un ciclo celular de CSC comprende el uso de un análisis rápido basado en citometría de flujo. Se recogen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre y médula ósea leucémicas. Las PBMC se procesan a través de una columna de selección de CD34 y luego se tiñen en la superficie con anticuerpos conjugados con fluorescencia frente a marcadores de CSC. Las células se fijan durante la noche, se permeabilizan y finalmente se tiñen intracelularmente con anticuerpos conjugados con fluorescencia frente a Ki-67 y un producto químico fluorescente con fuerte afinidad por el ADN. Las células teñidas se analizan en un citómetro de flujo y se analiza la fracción de tinción CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> para determinar el estado del ciclo celular, véase la figura 1.

50 Tal como se usa en el presente documento, “muestra” se refiere a cualquier muestra de paciente, incluyendo pero sin limitarse a una muestra de líquido, células o tejido que comprende células cancerosas aisladas de un nicho, tal como médula, que se sospecha que contiene células madre cancerosas quiescentes. La muestra incluye, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de sangre fraccionada, una muestra de médula ósea, una biopsia, una muestra de tejido congelado, una muestra de tejido fresco, una muestra de células y/o una sección incrustada en parafina, que puede usarse para determinar si la muestra contiene, sin limitación, una célula madre de cáncer quiescente y la presencia de miembros de la familia de isoformas de BCL2 asociados con prosupervivencia. Preferiblemente, la muestra se obtiene de un nicho sospechoso de células madre de cáncer, por ejemplo, sin limitación, médula ósea y/o cripta intestinal.

55 En una realización, además del estado del ciclo celular, se cuantifica la expresión de la expresión de isoformas de BCL2; su combinación es un marcador, o pronóstico, de la supervivencia de CSC en un individuo, por ejemplo, en un entorno de nicho. En realizaciones alternativas, se usa reacción en cadena de la polimerasa, o PCR; o qPCR, o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, también llamada reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR) o reacción en cadena de la polimerasa cinética (KPCR), con, por ejemplo, cebadores específicos de isoformas de corte y empalme y/o secuenciación del transcriptoma completo. La cuantificación puede usarse para determinar la razón de isoformas de corte y empalme en CSC de diferentes nichos

para determinar si las CSC son más proapoptóticas o más antiapoptóticas en relación con células madre normales o CSC de otros nichos.

En el presente documento se da a conocer un método optimizado para determinar el estado del ciclo celular de CSC a partir de múltiples nichos tumorales y se compararon los efectos de diversas quimioterapias sobre el estado del ciclo celular, por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 1. Se caracterizó el patrón de expresión de isoformas de corte y empalme de cuatro miembros de la familia BCL2 en CSC de leucemia mieloide crónica (CML) en crisis blástica y se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de las isoformas largas de BCL2, MCL1, BCLX y BFI1 con progresión de la enfermedad, por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 2.

También se ha demostrado que el nicho tumoral es importante para determinar la respuesta de CSC a las terapias. Las CSC en el nicho de médula ósea son resistentes a la quimioterapia, tal como se ilustra en la figura 3 y esto puede deberse a una quiescencia aumentada (ciclo celular reducido) de la población de CSC, tal como se ilustra en la figura 4. Al seleccionar como diana miembros de la familia BCL2 con un inhibidor de pan-BCL2 (sabutoclax), se ha demostrado que la supervivencia de CSC en el nicho protector de médula ósea se ve alterada, tal como se ilustra en la figura 5 y esta respuesta a la terapia podría monitorizarse mediante la expresión de isoformas de corte y empalme de miembros de la familia BCL2 (tal como se ilustra en la figura 6) y/o el estado del ciclo celular (tal como se ilustra en la figura 7).

En realizaciones alternativas, los métodos dados a conocer en el presente documento determinan el estado del ciclo celular y la expresión de isoformas de corte y empalme de la familia BCL2 dentro de un entorno de nicho tumoral antes y después del tratamiento; en realizaciones alternativas, esto se usa de manera pronóstica para predecir la progresión de un tumor, por ejemplo, leucemia, y en realizaciones alternativas se usa para predecir si las CSC serán susceptibles a ciertos fármacos terapéuticos, así como para monitorizar la respuesta al tratamiento. En realizaciones alternativas, los métodos dados a conocer en el presente documento se usan para evaluar el estado del ciclo celular de CSC y la supervivencia en nichos tumorales en varios tumores malignos, incluyendo CML.

Aunque la divulgación en el presente documento no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, esta divulgación caracteriza cómo CSC de CML desregula las rutas de apoptosis mediante expresión diferencial de moléculas de la familia BCL2, y que estos cambios contribuyen a la capacidad de CSC para sobrevivir al trasplante en serie; y, alternativamente, esta divulgación describe la relación entre isoformas de miembros de la familia BCL2 y el equilibrio de señales proapoptóticas y antiapoptóticas en cáncer y células CSC.

En una realización, los métodos comprenden la cuantificación de al menos uno, varios o todos de los siguientes: una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas; o (2) un transcrito (ARNm, mensaje) que codifica una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas.

En una realización, se detecta y se mide un transcrito de BCL2 cortado y empalmado de manera alternativa o aberrante, por ejemplo, se detecta y se cuantifica la cantidad de transcritos de BCL2 más largos frente a más cortos. Por ejemplo, en una realización, la presencia de isoformas de corte y empalme de BCL2 más largas frente a más cortas es predictiva de un potencial de autorrenovación potenciado de una CSC. Los mensajes de BCL2 (transcritos), incluyendo isoformas de mensajes BCL2 (transcritos) cortados y empalmados de manera alternativa o aberrante, pueden detectarse y/o cuantificarse por PCR, por ejemplo, mediante Q-RT-PCR específica de isoformas de corte y empalme. En una realización, los métodos comprenden la cuantificación de uno cualquiera, varios o todos estos marcadores de isoforma(s) de corte y empalme de BCL2.

En una realización, los métodos de la invención se usan para predecir el aumento de la autorrenovación de una CSC, y su capacidad para inhibirse por inhibidores de la ruta de autorrenovación dirigidos. En realizaciones alternativas, estos métodos a modo de ejemplo permiten la determinación del estado de autorrenovación de una célula CSC y permiten la predicción de la capacidad farmacológica (por ejemplo, susceptibilidad a un fármaco) de una CSC, y la progresión del cáncer correspondiente. Por ejemplo, en una realización, la detección y cuantificación de que la célula contiene más de la isoforma de corte y empalme más larga de un mensaje de BCL2 (transcrito) que una isoforma de corte y empalme más corta del mensaje de BCL2 (transcrito) (junto con el estado del ciclo celular, por ejemplo, niveles de la quiescencia) es predictiva de un aumento del estado de autorrenovación de la célula CSC, es decir, predictiva de un potencial de autorrenovación potenciado de una CSC.

Aunque la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, las composiciones y los métodos de la invención pueden predecir un aumento de la autorrenovación de una CSC y su capacidad para inhibirse por inhibidores de la ruta de autorrenovación dirigidos debido a que los niveles de la isoforma de corte y empalme más larga de un mensaje de BCL2 (transcrito, ARNm) en una célula, junto con el estado del ciclo celular, por ejemplo, niveles de quiescencia, pueden determinar o predecir si esa célula es susceptible a los fármacos inhibidores de la ruta de autorrenovación; por tanto, la caracterización de la expresión del mensaje de BCL2 (transcrito, ARNm) y el estado del ciclo celular permite predecir la susceptibilidad a fármacos de las CSC.

Con respecto a la cuantificación de ARNm de la familia de BCL2, los métodos de la invención pueden detectar y/o diferenciar entre todas las isoformas de un gen o mensaje particular, por ejemplo, todas las isoformas de un gen de la familia BCL2 y/o la isoforma de ARNm. Al detectar y diferenciar entre todas las isoformas de un gen o mensaje

particular, en lugar de la cantidad total de sólo una isoforma de corte y empalme, por ejemplo, una isoforma de corte y empalme de BCL2 más larga o una isoforma de corte y empalme de miembros de la familia BCL2 más corta (que no correspondería necesariamente al estado de autorrenovación de la célula), la invención, mediante la medición de isoformas tanto más largas como más cortas (o todas las varias posibles isoformas cortadas y empalmadas alternativamente que están presentes al mismo tiempo en una célula), puede determinar mejor si hay cambios en el equilibrio de señales proautorrenovación (antidiferenciación) y proliferación.

En una realización, los métodos de la invención se usan para detectar y/o diferenciar todas las varias moléculas de la familia de isoformas de BCL2 cortadas y empalmadas alternativamente posibles; por ejemplo, para MCL1, un producto génico más largo (isoforma 1) puede potenciar la supervivencia celular al inhibir la apoptosis, mientras que el producto génico más corto cortado y empalmado alternativamente (isoforma 2) puede promover la apoptosis y es inductor de muerte. En una realización, se determinan la interferencia molecular entre moléculas de la familia de isoformas de BCL2 cortadas y empalmadas alternativamente y otras proteínas implicadas en el ciclo celular y/o apoptosis.

En realizaciones alternativas, las composiciones y métodos de la invención pueden usar cualquier método de citometría de flujo, cualquier PCR y/o cualquier técnica inmunohistoquímica para caracterizar la expresión molecular, por ejemplo, poblaciones de isoformas de corte y empalme o determinación de la transcripción completa, en una célula cancerosa, por ejemplo, en células de leucemia o en una población CSC. En realizaciones alternativas, los métodos de la invención se centran en detectar y cuantificar cambios en la expresión de la familia de isoformas de BCL2 en una población de CSC.

En una realización, los métodos de la invención cuantifican proteínas, por ejemplo, una proteína de la familia de isoformas de BCL2, en CSC mediante citometría de flujo, por ejemplo, FACS, por ejemplo, un análisis rápido basado en FACS. En una realización, se recogen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre o médula ósea leucémicas. En una realización, las PBMC se procesan a través de una columna de selección CD34 y luego se tiñen en la superficie con anticuerpos conjugados con fluorescencia. En una realización, las células se fijan con paraformaldehído, se permeabilizan con saponina y finalmente se tiñen intracelularmente con anticuerpos conjugados con fluorescencia para detectar proteínas de la familia BCL2. Las células teñidas se procesan en un clasificador de células FACS Aria y se analiza la fracción de tinción CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>linaje<sup>-</sup> para determinar la expresión de proteínas de la familia BCL2.

En una realización, los métodos de la invención cuantifican el mensaje (ARNm) usando PCR, por ejemplo, usando qPCR, usando cebadores específicos de isoformas de corte y empalme para cuantificar la cantidad de isoformas de corte y empalme de proteínas de la familia BCL2. En una realización, la cuantificación se usa entonces para determinar la razón de isoformas de corte y empalme que proporciona una determinación relativa de si las células son más proapoptóticas o más antiapoptóticas. En realizaciones alternativas, la cuantificación de ARNm usando qPCR y cebadores específicos de isoformas de corte y empalme para cuantificar la cantidad de isoformas de corte y empalme de las proteínas de la familia BCL2 permite la cuantificación y determinación de la razón de isoformas de corte y empalme de transcrito largo de BCL2 (por ejemplo, MCL1) frente a transcrito corto de BCL2 (por ejemplo, MCL1) que proporciona una determinación relativa de si las células son más proapoptóticas o más antiapoptóticas.

En una realización, los métodos de esta invención se usan para determinar y medir el nivel de proteínas de la familia de isoformas de BCL2 (por ejemplo, MCL1) y las razones de transcritos en CSC por razones de pronóstico, por ejemplo, para predecir la progresión del cáncer y/o para predecir si las CSC serán susceptibles a ciertos fármacos terapéuticos. En una realización, las composiciones y los métodos de esta invención son aplicables a CSC en varios tumores malignos incluyendo CML.

#### Polipéptidos y péptidos

En realizaciones alternativas, la invención proporciona métodos para determinar y medir los niveles de transcritos y proteínas de la familia BCL2 (por ejemplo, MCL1), y/o las razones de proteínas y transcritos de la familia de BCL2 (por ejemplo, MCL1) en células madre, por ejemplo, CSC, por razones de diagnóstico, descubrimiento de fármacos y pronóstico.

Los polipéptidos y péptidos usados para poner en práctica la invención (por ejemplo, como controles, para generar anticuerpos frente a la familia de proteína BCL2 (por ejemplo, MCL1)) pueden comprender una proteína recombinante, una proteína sintética, un peptidomimético, un péptido no natural, o una combinación de los mismos. Los péptidos y proteínas usados para poner en práctica la invención pueden expresarse de manera recombinante *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos y polipéptidos usados para poner en práctica la invención pueden prepararse y aislarse usando cualquier método conocido en la técnica. Los polipéptidos y péptidos usados para poner en práctica la invención también pueden sintetizarse, en su totalidad o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215-223; Horn (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 225-232; Banga, A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede realizarse usando diversas técnicas en fase sólida (véanse por ejemplo, Roberge (1995) *Science* 269:202; Merrifield (1997) *Methods Enzymol.* 289:3-13) incluyendo cualquier síntesis de polipéptidos automatizada conocida en la técnica.

## Anticuerpos

En realizaciones alternativas, los métodos de la invención comprenden el uso de anticuerpos para determinar y medir los niveles de proteínas y transcritos de la familia BCL2 (por ejemplo, MCL1), y/o las razones de proteínas y transcritos de la familia BCL2 (por ejemplo, MCL1) en células madre, por ejemplo, CSC, por razones de diagnóstico, descubrimiento de fármacos y pronóstico.

En aspectos alternativos, un anticuerpo para poner en práctica la invención puede comprender un péptido o polipéptido derivado de, modelado después de o sustancialmente codificado por una proteína de la familia BCL2, o fragmentos inmunogénicos de la misma, que puede unirse específicamente a un antígeno o epítipo, véase, por ejemplo *Fundamental Immunology*, tercera edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) *Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. En aspectos alternativos, un anticuerpo para poner en práctica la invención incluye porciones de unión a antígeno, es decir, "sitios de unión a antígeno", (por ejemplo, fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de complementariedad (CDR)) que retienen la capacidad de unirse al antígeno (por ejemplo, una proteína de la familia BCL2, o fragmentos inmunogénicos de la misma) incluyendo (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341 :544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. También se incluyen anticuerpos de cadena sencilla mediante referencia en el término "anticuerpo".

Los expertos en la técnica conocen métodos de inmunización, producción y aislamiento de anticuerpos (policlonales y monoclonales) y se describen en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (7<sup>a</sup> ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites"); Coding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (2<sup>a</sup> ed.) Academic Press, Nueva York, NY (1986); Kohler (1975) *Nature* 256:495; Harlow (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York. Los anticuerpos también pueden generarse *in vitro*, por ejemplo, usando bibliotecas de presentación en fago que expresan sitios de unión a anticuerpos recombinantes, además de los métodos *in vivo* tradicionales usando animales. Véanse, por ejemplo, Hoogenboom (1997) *Trends Biotechnol.* 15:62-70; Katz (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45.

En realizaciones alternativas, los anticuerpos usados para poner en práctica esta invención comprenden anticuerpos "madurados por afinidad", por ejemplo, anticuerpos que comprenden una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno; por ejemplo, una proteína de la familia BCL2 (por ejemplo, MCL1), o fragmentos inmunogénicos de la misma. En realizaciones alternativas, los anticuerpos usados para poner en práctica esta invención son anticuerpos madurados que tienen afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana, por ejemplo, un factor de activación transcripcional dirigido. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

## Generación y manipulación de ácidos nucleicos

En realizaciones alternativas, los métodos de la invención usan ácidos nucleicos para detectar y cuantificar los niveles de un transcrito (ARNm, mensaje) de una isoforma de corte y empalme de transcrito de BCL2 (por ejemplo, MCL1). En realizaciones alternativas, un método de la invención usa ácidos nucleicos para detectar y cuantificar los niveles de un transcrito (ARNm, mensaje) de una isoforma de corte y empalme de ARNm más larga frente a una isoforma de BCL2 (por ejemplo, MCL1) más corta.

En realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos usados para poner en práctica la invención se producen, se aíslan y/o se manipulan, por ejemplo, mediante clonación y expresión de bibliotecas de ADNc, amplificación del mensaje o ADN genómico por PCR, y similares.

Los ácidos nucleicos usados para poner en práctica esta invención, ya sea ARN, ARNi, ácido nucleico antisentido, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, pueden aislarse de una variedad de fuentes, modificarse por ingeniería genética, amplificarse y/o expresarse/generarse de manera recombinante. Los polipéptidos recombinantes generados a partir de estos ácidos nucleicos pueden aislarse o clonarse individualmente y someterse a prueba para determinar la actividad deseada. Puede usarse cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo, por ejemplo, sistemas de expresión de células bacterianas, fúngicas, de mamíferos, levaduras, insectos o vegetales.

Alternativamente, los ácidos nucleicos usados para poner en práctica esta invención pueden sintetizarse *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas, tal como se describe en, por ejemplo, Adams (1983) *Am. Chem. Soc.* 105:661; Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19: 373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33: 7886-7896; Narang (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109; Beaucage (1981) *Tetra. Lett.* 22: 1859; patente estadounidense n.º 4.458.066.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos usadas para poner en práctica esta invención, tales como, por ejemplo, subclonación, sondas de marcaje (por ejemplo, marcaje con cebadores al azar usando polimerasa Klenow, traducción de mellas, amplificación), secuenciación, hibridación y similares se describen bien en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª ED.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZACIÓN WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Otro medio útil para obtener y manipular los ácidos nucleicos usados para poner en práctica los métodos de la invención es clonar a partir de muestras genómicas y, si se desea, examinar y volver a clonar insertos aislados o amplificados a partir de, por ejemplo, clones genómicos o clones de ADNc. Las fuentes de ácido nucleico usadas en los métodos de la invención incluyen bibliotecas genómicas o de ADNc contenidas en, por ejemplo, cromosomas artificiales de mamíferos (MAC), véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.721.118; 6.025.155; cromosomas artificiales humanos, véase, por ejemplo, Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15: 333-335; cromosomas artificiales de levadura (YAC); cromosomas artificiales bacterianos (BAC); cromosomas artificiales P1, véase, por ejemplo, Woon (1998) Genomics 50: 306-316; vectores derivados de P1 (PAC), véase, por ejemplo, Kern (1997) Biotechniques 23: 120-124; cósmidos, virus recombinantes, fagos o plásmidos.

Los ácidos nucleicos o las secuencias de ácidos nucleicos usadas para poner en práctica esta invención pueden ser un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido, o un fragmento de cualquiera de estos, ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y puede representar una cadena sentido o antisentido, ácido nucleico peptídico (ANP), o a cualquier material similar al ADN o similar al ARN, de origen natural o sintético. Los compuestos usados para poner en práctica esta invención incluyen "ácidos nucleicos" o "secuencias de ácidos nucleicos" que incluyen oligonucleótidos, nucleótidos, polinucleótidos o cualquier fragmento de cualquiera de estos; e incluyen ADN o ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, ARNi) de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario; y puede ser una cadena sentido o antisentido, o un ácido nucleico peptídico (PNA), o cualquier material similar al ADN o similar al ARN, de origen natural o sintético, incluyendo, por ejemplo, ARNi, ribonucleoproteínas (por ejemplo, por ejemplo, ARNi bicatenarios, por ejemplo, iRNP). Los compuestos usados para poner en práctica esta invención incluyen ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. Los compuestos usados para poner en práctica esta invención incluyen estructuras similares a ácidos nucleicos con estructuras principales sintéticas, véanse, por ejemplo, Mata (1997) Toxicol. Apl. Pharmacol. 144: 189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36: 8692-8698; Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6: 153-156. Los compuestos usados para poner en práctica esta invención incluyen "oligonucleótidos" incluyendo un polidesoxinucleótido monocatenario o dos cadenas complementarias de polidesoxinucleótido que pueden sintetizarse químicamente. Los compuestos usados para poner en práctica esta invención incluyen oligonucleótidos sintéticos que no tienen fosfato 5', y por tanto no se unirán a otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en presencia de una cinasa. Un oligonucleótido sintético puede ligarse a un fragmento que no se ha desfosforilado.

La información de secuencia para diseñar cebadores para identificar isoformas de la familia BCL2 en reacciones de PCR y/o para diseñar compuestos, tales como antisentido, ribozimas, ARN de interferencia y similares para disminuir la expresión de proteínas BCL2 en células madre de cáncer se conoce en la técnica, por ejemplo, véanse las publicaciones estadounidenses n.º 2012/0172285 y 2009/0247613.

En aspectos alternativos, los compuestos usados para poner en práctica esta invención incluyen genes o cualquier segmento de ADN o ARN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; puede incluir regiones que preceden y siguen a la región codificante (líder y tráiler), así como, cuando sea aplicable, secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). "Operativamente unido" puede referirse a una relación funcional entre dos o más segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN). En aspectos alternativos, puede referirse a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor puede estar operativamente unido a una secuencia codificante, tal como un ácido nucleico usado para poner en práctica esta invención, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. En aspectos alternativos, las secuencias reguladoras de la transcripción del promotor pueden estar operativamente unidas a una secuencia transcrita en la que pueden estar físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, pueden ser de actuación en cis. En aspectos alternativos, las secuencias reguladoras de la transcripción, tales como potenciadores, no es necesario que estén físicamente contiguas o ubicadas en proximidad estrecha a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

En aspectos alternativos, la invención comprende el uso de "casetes de expresión" que comprenden una secuencia de nucleótidos usada para poner en práctica esta invención, que puede ser capaz de afectar a la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, un gen estructural o un transcrito (por ejemplo, que codifica para un DRP o anticuerpo) en un huésped compatible con tales secuencias. Los casetes de expresión pueden incluir al menos un promotor operativamente unido con la secuencia codificante del polipéptido o la secuencia inhibidora; y, en un aspecto, con otras secuencias, por ejemplo, señales de terminación de la transcripción. También pueden usarse factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, por ejemplo, potenciadores.

En aspectos alternativos, los casetes de expresión usados para poner en práctica esta invención también incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector de “ADN desnudo” recombinante, y similares. En aspectos alternativos, un “vector” usado para poner en práctica esta invención puede comprender un ácido nucleico que puede infectar, transfectar, transducir transitoria o permanentemente una célula. En aspectos alternativos, un vector usado para poner en práctica esta invención puede ser un ácido nucleico desnudo, o un ácido nucleico complejado con proteína o lípido. En aspectos alternativos, los vectores usados para poner en práctica esta invención pueden comprender ácidos nucleicos y/o proteínas, y/o membranas, y/o membranas virales o bacterianas (por ejemplo, una membrana celular, una envoltura lipídica viral, etc.). En aspectos alternativos, los vectores usados para poner en práctica esta invención pueden incluir, pero no se limitan a replicones (por ejemplo, replicones de ARN, bacteriófagos) a los que pueden unirse fragmentos de ADN y replicarse. Por tanto, los vectores incluyen, pero no se limitan a ARN, ADN o ARN circular o lineal o autorreplicante autónomo (por ejemplo, plásmidos, virus y similares, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.217.879), y pueden incluir tanto los plásmidos de expresión como los de no expresión. En aspectos alternativos, el vector usado para poner en práctica esta invención puede replicarse de manera estable por las células durante la mitosis como una estructura autónoma, o puede incorporarse dentro del genoma del huésped.

En aspectos alternativos, los “promotores” usados para poner en práctica esta invención incluyen todas las secuencias capaces de dirigir la transcripción de una secuencia codificante en una célula, por ejemplo, una célula de mamífero tal como una célula cerebral. Por tanto, los promotores usados en los constructos de la invención incluyen elementos de control de la transcripción de actuación en cis y secuencias reguladoras que participan en la regulación o modulación del momento y/o la velocidad de transcripción de un gen. Por ejemplo, un promotor usado para poner en práctica esta invención puede ser un elemento de control de la transcripción de actuación en cis, incluyendo un potenciador, un promotor, un terminador de transcripción, un origen de replicación, una secuencia de integración cromosómica, regiones no traducidas en 5' y 3' o una secuencia intrónica, que participa en la regulación transcripcional. Estas secuencias de actuación en cis normalmente interactúan con proteínas u otras biomoléculas para llevar a cabo (activar/desactivar, regular, modular, etc.) la transcripción.

Los promotores “constitutivos” usados para poner en práctica esta invención pueden ser aquellos que dirigen la expresión continuamente en la mayoría de las condiciones ambientales y estados de desarrollo o diferenciación celular. Los promotores “inducibles” o “regulables” usados para poner en práctica esta invención pueden dirigir la expresión del ácido nucleico de la invención bajo la influencia de condiciones ambientales o condiciones de desarrollo.

#### Kits e instrucciones

También se dan a conocer kits que comprenden composiciones (por ejemplo, cebadores de PCR que discriminan isoformas y/o que detectan isoformas de MCL1, BCLX y BFL1) y/o instrucciones para poner en práctica los métodos de la invención. Como tales, también pueden proporcionarse kits, células, vectores y similares.

#### 35 Ejemplos

##### Métodos-BCL2:

##### Preparación de muestras de pacientes y clasificación por FACS

Se adquirieron muestras de sangre de cordón umbilical normal y sangre periférica adulta de All Cells. Se obtuvieron muestras de CML de pacientes que dieron su consentimiento en la Universidad de California en San Diego, Universidad de Stanford, la Red Sanitaria de la Universidad de Toronto, MD Anderson y la Universidad de Bolonia según protocolos aprobados por la Junta de Revisión Institucional. Inicialmente, se purificaron células CD34<sup>+</sup> mediante separación con perlas magnéticas (MACS; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) seguido por purificación de progenitoras por FACS usando anticuerpos frente a CD34 y CD38 específicos de seres humanos tal como se describió anteriormente (Jaiswal, S., *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 100, 10002-10007 (2003); Jamieson, C.H., *et al.* N Engl J Med 351, 657-667 (2004)). Se extrajeron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre periférica tras la centrifugación por densidad en Ficoll, se seleccionaron CD34<sup>+</sup>, se tiñeron con anticuerpos conjugados fluorescentes y se analizaron y purificaron usando un instrumento FACS Aria y software Flowjo tal como se describe (Jaiswal, S. *et al.* citado anteriormente y Jamieson, C.H., *et al.* citado anteriormente).

##### Análisis de isoformas de corte y empalme de la familia BCL2

50 Se tiñeron células CD34<sup>+</sup> de CML o normales con anticuerpo monoclonal de ratón anti-BCL2 humana (Dako) y se analizaron mediante FACS. Se realizó RT-PCR cuantitativa para detectar isoformas de BCL2, MCL1, BCLX y BFL1 en progenitoras con CML frente a normales clasificados por FACS con el kit de qRT-PCR de dos etapas SYBR GreenER (Invitrogen).

55 También se analizaron los genes de BCL2 en células de CML injertadas. En resumen, se clasificaron por FACS 20.000-50.000 células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> a partir de tejidos injertados y se analizaron usando qRT-PCR específica de isoforma o usando una “nanoplaaca” OpenArray (Invitrogen) de ruta de apoptosis para RT-PCR. También se midió la proteína BCL2 en células de tejido injertado tal como se describe en el presente documento.

RT-PCR cuantitativa

Se clasificaron 20.000-50.000 células progenitoras hematopoyéticas de las poblaciones de células indicadas usando FACS, se aisló el ARN total y se sintetizó ADNc tal como se describe (véanse Jaiswal, S. *et al.* citado anteriormente y Jamieson, C.H., *et al.* citado anteriormente). Se realizó PCR cuantitativa (qRT-PCR) por duplicado en un instrumento iCycler usando SYBR GreenER Super Mix (Invitrogen, Carlsbad, California), 5 ng de ARNm de molde y 0,4 mM de cada cebador directo e inverso. Se diseñaron cebadores específicos de isoformas de corte y empalme para BCL2, MCL1, BCLX y BFL1 y se confirmó la especificidad de isoforma mediante secuenciación de cada producto de PCR.

Se usaron los siguientes cebadores:

- 10 BCL2L directo: atgtgtgtggagagcgtcaa (SEQ. ID. NO: 1)  
 BCL2L inverso: ttcagagacagccaggagaaa (SEQ. ID. NO: 2)  
 MCL1L directo: agaccttacgacgggttgg (SEQ. ID. NO: 3)  
 MCL1L inverso: aatcctgccccagttgtta (SEQ. ID. NO: 4)  
 MCL1S directo: gaggaggacgagttgtaccg (SEQ. ID. NO: 5)  
 15 MCL1S inverso: actccacaaacctccttg (SEQ. ID. NO: 6)  
 BCLXL directo: catggcagcagtaaagcaag (SEQ. ID. NO: 7)  
 BCLXL inverso: gaaggagaaaaaggccacaa (SEQ. ID. NO: 8)  
 BFL1L directo: gctgggaaaatggctttg (SEQ. ID. NO: 9)  
 BFL1L inverso: tcagaaaaattaggccggttt (SEQ. ID. NO: 10)  
 20 BCR-ABL directo: ctccagactgtccacagcat (SEQ. ID. NO: 11)  
 BCR-ABL inverso: ccctgaggctcaaagtcaga (SEQ. ID. NO: 12)  
 HPRT directo: cgtcttgctcgagatgtgatg (SEQ. ID. NO: 13)  
 HPRT inverso: ttatagcccccttgagcac (SEQ. ID. NO: 14)

25 Los niveles de ARNm para cada transcrito se normalizaron a HPRT y se compararon usando el método delta-delta CT.

Análisis de FACS de BCL2

30 Se tiñeron células CD34<sup>+</sup> normales, CML en CP y CML en BC con anticuerpos de linaje y anticuerpos de progenitoras tal como se describió anteriormente (véanse Jaiswal, S. *et al.* citado anteriormente y Jamieson, C.H., *et al.* citado anteriormente), y se fijaron con paraformaldehído al 0,8% (PFA) durante 10 min. Entonces se lavaron las células y se tiñeron durante la noche con un anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con FITC específico para BCL2 humana (Dako, n.º F7053) o anticuerpo de control de isotipo diluido en saponina al 0,15% (TCI America). El día siguiente, se lavaron las células y se analizaron usando un instrumento FACS Aria y software Flowjo. Se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) para BCL2 para cada muestra de CML y se normalizó a una muestra de control normal en el mismo experimento.

35 Trasplante, tratamiento con dasatinib y sabutoclax *in vivo*, análisis de injerto y trasplante en serie

40 Se criaron y mantuvieron ratones RAG2<sup>-/-</sup>yc<sup>-/-</sup> inmunocomprometidos en el vivario del Centro de Cáncer Moores de la Universidad de California en San Diego. A los ratones recién nacidos se les trasplantaron por vía intrahepática 50.000-200.000 células CD34<sup>+</sup> según los métodos previamente publicados (véanse Jaiswal, S. *et al.* citado anteriormente y Jamieson, C.H., *et al.* citado anteriormente). Se examinaron los ratones trasplantados para detectar la formación de tumores o injerto humano en sangre periférica mediante FACS a las 6-8 semanas tras el trasplante. Tras la detección de tumores, injerto de sangre periférica, o a las 8-12 semanas tras el trasplante, se trataron los ratones injertados durante 2 semanas con dasatinib (diariamente, 50 mg/kg/día en el 50% de PEG, el 50% de PBS mediante sonda oral), sabutoclax (3 días a la semana, 5 mg/kg/día en el 10% de EtOH, el 10% de Cremaphor EL (Sigma Aldrich) el 80% de PBS mediante inyección i.p.), o vehículos de fármaco. Veinticuatro horas tras el tratamiento (10-14 semanas tras el trasplante), se sacrificaron los ratones y se analizaron suspensiones de células individuales de tejidos hematopoyéticos para detectar injerto humano mediante FACS tal como se describió

anteriormente (véanse Jaiswal, S. *et al.* y Jamieson, C.H., *et al.* citados anteriormente). Para estudios de combinación *in vivo*, se usó dasatinib a 25 ó 50 mg/kg mientras que se usó sabutoclax a 1,25 ó 2,5 mg/kg con el mismo régimen de dosificación descrito anteriormente. Para el trasplante en serie, se preparó una mezcla de médulas óseas de ratón completas a partir de ratones en el mismo grupo de tratamiento. Entonces se contaron las células de médula ósea totales usando el reactivo Guava ViaCount y análisis en un sistema Guava PCA (Millipore), y se trasplantaron en números iguales a receptores recién nacidos secundarios mediante inyección intrahepática. Se inyectaron 250.000 células de médula ósea completa por ratón.

#### Tinción con DiR y medición mediante FACS

Se aislaron 50.000 células de CML CD34<sup>+</sup> tal como se describió anteriormente y se tiñeron con DiR 4 mg/ml (Invitrogen) en PBS según las especificaciones del fabricante. Entonces se lavaron las células teñidas con DiR y se trasplantaron a ratones recién nacidos. Tras 18 semanas, se sacrificaron los ratones y se analizaron los tejidos hematopoyéticos mediante FACS para células DiR<sup>+</sup> humanas. Se midió la MFI de DiR en células CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> humanas injertadas en cada tejido.

#### Análisis del ciclo celular por FACS

Suspensiones de células individuales de células de médula ósea de ratones tratados con sabutoclax o vehículo se sometieron a inmunotinción con anticuerpo anti-CD45 humano conjugado con Alexa405 (Invitrogen), anti-CD38 humano-Alexa647 (Ab Serotec) y anti-CD34 humano-biotina (Invitrogen) más Alexa488-estreptavidina (Invitrogen) en suero bovino fetal al 2%/PBS seguido por tinción de células vivas usando el kit de tinción de células muertas por IR cercano fijable LIVE/DEAD® (Invitrogen). Entonces se fijaron las células teñidas en la superficie en etanol al 70% durante la noche. Las células fijadas, teñidas en la superficie se sometieron a inmunotinción con anticuerpo anti-Ki-67 conjugado con PE (BD) en saponina al 0,15%/suero bovino fetal al 2%/PBS, se lavaron dos veces en medios de tinción que contenían saponina y se incubaron con 7-AAD (Invitrogen, 10 µg/ml en citrato de sodio 0,1 M/EDTA 5 mM pH 8,0/NaCl 0,15 M/BSA al 0,5%/saponina al 0,02%). Se analizaron las muestras teñidas usando un instrumento FACSAria y FlowJo.

#### IHC e IF de médula ósea

Para IHC, se recogieron fémures de animales trasplantados, tratados, se fijaron y descalcificaron en Cal-Ex II (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) durante 48 h, seguido por procesamiento de tejido convencional, incrustación en parafina y corte. Se desparafinizaron las secciones de tejido en parafina, se rehidrataron y se sometieron a ebullición en disolución de recuperación de antígeno (BD, California) (pH 6,0) durante 10 min para recuperar el antígeno. Se bloquearon los tejidos con albúmina sérica bovina al 5% (BSA) y Triton X-100 al 0,25% en PBS durante 30 min y se incubaron con anticuerpo primario en PBS con BSA al 1% a 4°C durante 16 h. Los anticuerpos primarios usados fueron CD45 humano (Abeam) y ki67 (BD). Entonces se llevó a cabo la tinción con IHC con el kit LSAB System-HRP (Dako Cytomation, Hamburgo, Alemania) según el protocolo del fabricante usando verde de metilo (Sigma Aldrich) como contratinción. Se usó la omisión de los anticuerpos primarios como control negativo y no mostró tinción. Todas las secciones se montaron antes del examen usando un microscopio Nikon Eclipse E600.

Para IF, se fijaron los fémures en PFA al 4% (EMS, Hatfield, PA) durante 1 hora, se descalcificaron en EDTA 0,23 M pH 7,0 durante 4 días cambiando la disolución de descalcificación dos veces al día, se deshidrataron en sacarosa al 30% y se congelaron en OCT. Para la inmunotinción, se cortó el tejido crioprotectado a 10 µm, se lavó con PBS, se fijó con PFA al 4% durante 10 minutos y se enjuagó con PBS. Se incubaron las secciones con suero de asno normal al 5%/Triton X-100 al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente seguido por incubación con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Se usaron anticuerpos de ratón con el kit MOM (Vector, Burlingame, CA). Se usaron anticuerpos de ratón con el kit MOM (Vector, Burlingame, CA). Los anticuerpos primarios usados fueron anti-fosfohistona H3, Ser10 (1:500, Cell Signaling, Inc.), anti-Ki-67 humano (1:300, Spring Bioscience), anti-CD34 humano (1:250, BD Biosciences), anti-CD38 conjugado con Alexa 647 (1:25, Serotec) y anti-BCL2 humana conjugado con FITC (1:25, Dako). Se lavaron los portaobjetos en PBS y se incubaron con anticuerpo secundario (anticuerpo de asno anti-ratón o conejo conjugado con Alexa 594, Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se montaron las secciones teñidas usando agente antidesvanecimiento Prolong® Gold con DAPI (Invitrogen). Se adquirieron imágenes de epifluorescencia usando un microscopio confocal (Zeiss LSM510 o Olympus Fluoview FV10i) y Adobe Photoshop CS5.

Para el análisis de la apoptosis, se tiñen médulas óseas usando el kit de detección de apoptosis TUNEL *in situ* con fluoresceína ApopTag (Chemicon, n.º S7110) siguiendo el protocolo del fabricante. Se montan secciones como anteriormente. Se adquieren imágenes usando microscopio de barrido automatizado Applied Imaging Ariol SL-50 y un sistema de análisis de imágenes.

#### Matriz de apoptosis por RT-PCR

Se analizaron células progenitoras clasificadas por FACS usando la tecnología de "nanoplaca" OpenArray (Invitrogen). En resumen, se clasificaron 20.000 células progenitoras de la médula ósea y el bazo de ratones injertados con BC en tampón de lisis (kit Cell-to-Ct, Life Technologies) seguido por tratamiento con ADNasa y reacción de transcripción inversa. Se amplifican previamente 20 µl de ADNc durante 12 ciclos con un conjunto de

ensayos Taqman específicos de genes dispuestos sobre una placa OpenArray de apoptosis Taqman. Se mezcla el ADNc preamplificado diluido (1:20) (1,5 ul) con mezcla de PCR GeneFast Taqman (3,5 ul) (Life Technologies, Inc) y se dispensa en la placa OpenArray. Se someten a prueba veinticuatro muestras de ADNc simultáneamente por placa OpenArray. Se produce PCR en tiempo real en un ciclador térmico NT OpenArray de obtención de imágenes controlado por ordenador. Se construyen las curvas de amplificación para orificio pasante en la matriz a partir de las imágenes recogidas, a partir de las cuales se calcula el umbral de ciclo (CT) y se usa para análisis de datos adicionales. Se normalizan los niveles génicos a la media geométrica de RPLPO, ACTB, PPIA, PGK1 y B2M y se comparan usando el método de delta-delta CT.

Análisis por IHC de BCL2 y MCL1 de médula ósea

- 5 Se fijaron muestras de hueso y se descalcificaron levemente en disolución de Bouin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 8 h a temperatura ambiente, luego se fijaron posteriormente en formalina tamponada que contenía zinc (Z-Fix; Anatech Ltd., Battle Creek, MI) durante 3 días a 4°C, y se incrustaron en parafina. Secciones de tejido desecado (4-5 µm) se sometieron a inmunotinción usando anticuerpo monoclonal de ratón frente a CD34 (DakoCytomation, Carpintería, CA) y anticuerpos policlonales de conejo frente a BCL2 y MCL1 contra péptidos sintéticos. Se exploraron los portaobjetos a un aumento absoluto de 400x (resolución de 0,25 µm/pixel (100.000 pix/in.)) usando el sistema Aperio ScanScope CS (Aperio Technologies, Vista, CA). Se aplicaron el paquete de algoritmo de análisis Spectrum y el software de análisis ImageScope (versión 9; Aperio Technologies, Inc.) para cuantificar las tinciones de IHC.

Cocultivo de SL/M2

- 20 Las líneas de células estromales de médula ósea de ratón M2-10B4 (M2) y SL/SL (SL) las proporciona StemCell Technologies y se someten a pase según métodos previamente publicados (Hogge, D.E., *et al.*, Blood 88, 3765-3773 (1996)). Un día antes del cocultivo, se tratan las líneas celulares con mitomicina-C (1 mg/ml durante 3 horas) y se siembran en placa en una mezcla 1:1 en una concentración total de 100.000/ml. Tras 24 horas, se siembran en placa 10.000-20.000 células normales o de CML CD34<sup>+</sup> encima de las células SL/M2 adherentes, se cultivan durante 1-4 semanas en medio Myelocult H5100 (StemCell Technologies) y se cuantifica la frecuencia de células progenitoras humanas vivas mediante FACS.

Tratamiento con fármacos *in vitro* y análisis de la apoptosis

- 30 Se mantuvieron cultivos de células normales y de CML CD34<sup>+</sup> solos en medio Stempro (Invitrogen) o en estroma de SL/M2 tal como se describió anteriormente. Un día tras la siembra en placa, se trataron las células cultivadas con diferentes concentraciones de sabutoclax diluido en DMSO. Tras 1 semana de cultivo, se cuantificaron las células CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> vivas mediante análisis de FACS. Para el análisis de la apoptosis, se recogieron células tratadas tras 24 horas y se analizaron para detectar caspasa-3 activada mediante FACS usando el ensayo NucView-488 (Biotium, Hayward, California) según las especificaciones del fabricante. Se generaron líneas de mejor ajuste y determinaciones de CI<sub>50</sub> ajustando los datos experimentales usando un modelo de regresión no lineal de respuesta a la dosis sigmoidea con controles de vehículo fijados a 1 nM para facilitar la representación gráfica de los datos en una escala logarítmica.

Ensayos de colonias

- 40 Tras el cultivo *in vitro* en medio Stempro o con estroma de SL/M2, se recogieron células humanas, se contaron mediante exclusión de azul tripano o usando reactivo Guava ViaCount y análisis en un sistema Guava PCA (Millipore), y se sembraron en placa 100-200 células por pocillo en una placa de 24 pocillos en medio Metocult (Stemcell Technologies). Tras 2 semanas, se contaron las colonias totales.

Experimento de combinación *ex vivo*

- 45 A ratones recién nacidos se les trasplantaron 10.000 células BC CD34<sup>+</sup> y se trataron con sabutoclax 5 mg/kg (n=3) o vehículo (n=3) comenzando a las 8 semanas tras el trasplante tal como se describió anteriormente. Tras 72 horas de tratamiento se sacrificaron los ratones, se recogió la médula ósea y se clasificaron por FACS las progenitoras a partir de cada ratón individual. Entonces se distribuyeron 10.000-20.000 progenitoras clasificadas a partir de los ratones individuales por pocillo sobre estroma de SL/M2 confluyente en placas de 24 pocillos y se trataron con dosis crecientes de dasatinib durante 1 semana. Tras el tratamiento de 1 semana, se recogieron los cocultivos y se analizaron para detectar células progenitoras BC vivas mediante FACS tal como se describió anteriormente.

- 50 Resultados

- 55 Aunque estudios han vinculado la regulación por incremento de BCL2 con la progresión de la fase crónica (CP) a la fase blástica (BC) en leucemia mieloide crónica (CML), la mayoría se han centrado en líneas celulares que expresan BCR-ABL (Sanchez-Garcia, I. & Grutz, G. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 5287-5291 (1995); Amarante-Mendes, G.P., *et al.* Oncogene 16, 1383-1390 (1998); Gesbert, F. & Griffin, J.D. Blood 96, 2269-2276 (2000)); o células CD34<sup>+</sup> a granel (Horita, M., *et al.* J Exp Med 191, 977-984 (2000). Aichberger, K.J., *et al.* Blood 105, 3303-3311 (2005). Radich, J.P., *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2794-2799 (2006)) en vez de células madre de leucemia (LSC) en

BC validadas funcionalmente. Informes recientes muestran que los genes de la familia BCL2 codifican para variantes de corte y empalme con funciones alternativas. (Moore, M.J., *et al.*, Cell 142, 625-636 (2010)). Sin embargo, hay relativamente poca información sobre la expresión de variantes de corte y empalme de BCL2 en LSC de BC. Tal como se da a conocer en el presente documento, se usó qRT-PCR específica de isoformas de corte y empalme para analizar la expresión de isoformas de la familia BCL2 en progenitoras de BC, CP y normales primarias clasificadas. LSC de BC expresaban niveles significativamente superiores de BCL2L, MCL1L, BCLXL y BFL1L prosupervivencia que las progenitoras de CP (figura 2). Tanto la qRT-PCR como la secuenciación del ARN también revelaron una sobrerrepresentación significativa de isoformas largas de MCL1 en comparación con isoformas cortas en LSC de BC (figura 6). Estos datos demuestran que los genes de la familia de BCL2 prosupervivencia están globalmente regulados por incremento en LSC de CML con la progresión de la enfermedad.

Se injertan LSC de BC quiescentes en el nicho de la médula y son resistentes a dasatinib.

Además de la expresión de isoformas de BCL2 alterada, estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que microentornos de soporte hacen a las LSC quiescentes y resistentes a la terapia (Barnes, D.J. & Melo, J.V. Cell Cycle 5, 2862-2866 (2006); Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C. & Eaves, Blood 94, 2056-2064 (1999); Saito, Y., *et al.* Nat Biotechnol 28, 275-280 (2010); Bewry, N.N., *et al.* Mol Cancer Ther 7, 3169-3175 (2008)). Para investigar cómo el microentorno contribuye a la supervivencia de LSC, se examinaron LSC de BC en diversos nichos hematopoyéticos usando un modelo de xenoinjerto. Tras el trasplante de células CD34<sup>+</sup> de CML en BC humanas en ratones RAG2<sup>-/-</sup>yc<sup>-/-</sup> recién nacidos (Abrahamsson, AE, *et al.*, citado anteriormente), podía detectarse formación de sarcoma mielóide e injerto leucémico en tejidos hematopoyéticos a las 8-10 semanas tras el trasplante (datos no mostrados). Para evaluar cuantitativamente si LSC de BC quiescentes tenían una predilección por un microentorno particular, se marcaron progenitoras leucémicas con DiR, un colorante fluorescente unido a la membrana que persiste sólo en células que no se dividen, y se midió la fluorescencia de DiR en células leucémicas en los diversos entornos. Las células BC residentes en la médula retenían significativamente más fluorescencia de DiR que las injertadas en otros tejidos (figura 4a). A continuación se examinó el perfil del ciclo celular de células injertadas en la médula usando análisis de citometría de flujo de Ki67/7-AAD, que demostró una población distinta de progenitoras GO (Ki67<sup>low</sup>7-AAD<sup>low</sup>) (figura 4b-c). Esta observación se confirmó mediante análisis inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia de médula ósea injertada con BC usando Ki67 y el marcador de mitosis fosfo-Histona-H3 (pHis-H3) (figura 4d-e). Los resultados también revelaron el enriquecimiento de células leucémicas CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>pHis-H3- y Ki-67<sup>low</sup> adyacentes al endostio (figura 4d-e), similar a lo notificado en los modelos de xenoinjerto de LSC de AML 31. Conjuntamente, estos datos indican que residen LSC de BC quiescentes en el nicho de la médula y que pueden residir preferentemente en el espacio endóstico.

A continuación se examinó la eficacia de dasatinib, un inhibidor de tirosina cinasa (TKI) dirigido a BCR-ABL, contra LSC en los diversos nichos hematopoyéticos. Ratones trasplantados con células CD34<sup>+</sup> BC tenían un alto injerto de células CD45<sup>+</sup> humanas en todos los tejidos hematopoyéticos. También pudieron detectarse células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> en todos los tejidos. El tratamiento con dasatinib (50 mg/kg) redujo significativamente la carga leucémica de CD45<sup>+</sup> en todos los tejidos en comparación con los controles tratados con vehículo (figura 3a). Sin embargo, permaneció una población resistente a dasatinib en la médula tras el tratamiento y era incluso más evidente cuando se examinó el injerto de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>. De manera importante, la resistencia a TKI no se debía a una falta de disponibilidad del fármaco en la médula porque las células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> de la médula clasificadas por FACS tenían una reducción significativa en la fosforilación de CRKL, una medida directa de la actividad de BCR-ABL, tras el tratamiento con dasatinib (datos no mostrados). Además, el perfil del ciclo celular de LSC injertadas en la médula tras el tratamiento con dasatinib indicó un desplazamiento significativo hacia la quiescencia (figura 1(d)). Conjuntamente, estos datos demuestran que LSC de BC quiescentes en el microentorno de la médula ósea están protegidas del tratamiento con TKI a través de mecanismos independientes de BCRABL. Además, se enriquecen LSC de BC quiescentes en la médula tras el tratamiento con TKI.

Sabutoclax sensibiliza LSC de BC injertadas en el nicho de la médula a dasatinib

Para examinar la necesidad de la expresión de la familia BCL2 prosupervivencia para la función de LSC, se sometió a prueba la eficacia de sabutoclax contra LSC *in vivo* (figura 5). En ratones trasplantados con BC, sabutoclax (5 mg/kg) redujo significativamente el injerto de LSC en todos los tejidos hematopoyéticos incluyendo la médula ósea (figura 5b). La médula ósea injertada con LSC de BC tenía una cantidad reducida de células inmunopositivas para BCL2 y MCL1 tras el tratamiento con sabutoclax (datos no mostrados) así como un ligero aumento en células G2/S (figura 7) y células apoptóticas TUNEL<sup>+</sup> aumentadas, lo que sugiere que se destruyeron células BC quiescentes mediante apoptosis.

A continuación se examinó si sabutoclax podría sensibilizar LSC en el nicho de la médula a TKI. Se trataron ratones injertados con BC con sabutoclax (1,25 mg/kg), dasatinib (25 mg/kg) o una combinación de los dos fármacos y se analizó el injerto de LSC mediante FACS. Se usaron dosis inferiores de ambos fármacos de modo que cualquier efecto combinado pudiera resolverse más fácilmente. Aunque dasatinib y sabutoclax solos no tenían ningún efecto sobre el injerto de LSC en la médula a estas dosis inferiores, hubo una reducción significativa de LSC en la médula tras el tratamiento de combinación en comparación con los controles tratados con vehículo (tabla 1). A dosis superiores (dasatinib 50 mg/kg, sabutoclax 2,5 mg/kg), esta diferencia era más pronunciada y hubo una reducción de -90% en la carga de LSC tras el tratamiento de combinación (tabla 1).

5 También se examinó la médula tratada con la combinación en más detalle mediante análisis inmunohistoquímico. En comparación con el tratamiento con dasatinib solo, las médulas tratadas con la combinación tenían una tendencia hacia una reducción de proteína BCL2 y MCL1 así como una tendencia hacia una expresión de Ki67 aumentada (figura 8c-d). Estos resultados sugieren que sabutoclax sensibiliza a células quiescentes, que expresan la familia BCL2, a la muerte celular mediada por dasatinib. Finalmente, para someter a prueba si se habían eliminado verdaderamente LSC funcionales, se trasplantó en serie médula ósea tratada a receptores secundarios y se monitorizó el tiempo de supervivencia. Los ratones que recibieron médula tratada mediante la combinación tenían una ventaja de supervivencia significativa en comparación con los que recibieron médula tratada con dasatinib a ambas dosis sometidas a prueba (figura 8(b)). Los datos globales demuestran que dasatinib solo, aunque eficaz en la reducción de la carga leucémica primaria, no erradica significativamente LSC residentes en la médula ósea. En cambio, la terapia con dasatinib y sabutoclax combinada inhibe significativamente tanto el injerto de LSC primario como en serie, lo que sugiere que se ha suprimido la resistencia a TKI.

Tabla 1. Efectos de sabutoclax en combinación con dasatinib en el injerto de LSC de BC en

Tratamiento a baja dosis	Injerto medio (EEM) de células CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>			2' TP - mediana de supervivencia (días)
	Bazo	Sangre	Médula	
Vehículo (n=10)	16,8 (3,7)	12,5 (4,8)	35,4 (12,4)	78,5 (n=12)
Sabutoclax (n=9)	12 (2,7)	11,0 (3,8)	34,2 (12,5)	74 (n=10)
Dasatinib (n=9)	2,0 (0,8)	2,1 (0,9)	28,8 (10,7)	79 (n=10)
Combinación (n=11)	0,6 (0,3)	0,6 (0,3)	15,5 (6,0)	88 (n=13)
Valor de p (dasatinib frente a combinación)	0,07	0,07	0,22	0,054
Tratamiento a alta dosis	Injerto medio (EEM) de células CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>			2' TP - mediana de supervivencia (días)
	Bazo	Sangre	Médula	
Vehículo (n=2)	10,3 (0,4)	27,7 (3,4)	38,58 (9,6)	57 (n=5)
Sabutoclax (n=2)	5,1 (1,5)	24,5 (17,6)	30,01 (23,2)	45 (n=5)
Dasatinib (n=3)	0,2 (0,07)	3,1 (2,4)	21,23 (2,4)	43 (n=3)
Combinación (n=2)	0,19 (0,16)	0,4 (0,37)	4,54 (2,3)	72 (n=4)
Valor de p (dasatinib frente a combinación)	0,91	0,44	0,018	0,01

15

**REIVINDICACIONES**

1. Método para predecir la capacidad farmacológica de una célula madre de leucemia (LSC), comprendiendo el método:
- 5 (i) detectar y cuantificar en al menos una o una pluralidad de LSC que se ha(n) proporcionado, en el que la pluralidad de LSC es del mismo nicho tumoral:
- 10 (a) una o más proteínas de la familia de linfoma-2 de células B (BCL2) o isoformas de proteínas, y/o un transcrito que codifica para una o más proteínas de la familia BCL2 o isoformas de proteínas, en el que el transcrito de la familia BCL2 se selecciona del grupo que consiste en un transcrito de BCL2, un transcrito de secuencia 1 de leucemia de células mieloides (MCL1), un transcrito de linfoma de células B extra grande (Bcl-XL) o un transcrito de BF11 o un transcrito de una proteína de la familia BCL2 proapoptótica; y
- (b) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la LSC; y
- (ii) comparar
- 15 (a) los niveles cuantificados de proteína o transcrito en la LSC con una célula que tiene un fenotipo de una célula madre normal o una LSC de otro nicho tumoral, o la cantidad de una isoforma de proteína con una segunda isoforma de proteína de la misma proteína, o la cantidad de transcrito que codifica para una isoforma de proteína con la cantidad de transcrito que codifica para una segunda isoforma de proteína de la misma proteína, y
- 20 (b) el estado del ciclo celular o la cantidad de quiescencia, o la salida del ciclo celular, de la LSC con una célula que tiene un fenotipo de una célula madre normal o una LSC de otro nicho tumoral;
- en el que la combinación de
- (a) la cantidad aumentada de quiescencia, o la salida del ciclo celular, en la LSC en comparación con una célula que tiene un fenotipo de una célula madre normal o una LSC de otro nicho tumoral, y
- 25 (b) más cantidad de una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2 y/o más cantidad de una proteína codificada por una forma de corte y empalme más larga de un transcrito de proteína de la familia BCL2 en comparación con la cantidad de una proteína codificada por una isoforma de corte y empalme alternativo más corta del transcrito de la familia BCL2,
- 30 indica una susceptibilidad de la LSC a un compuesto inhibidor de la ruta de autorrenovación, o una falta de susceptibilidad de la LSC a un fármaco o un compuesto pro-diferenciación.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la detección y cuantificación del transcrito comprende el uso de PCR.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la PCR comprende una Q-RT-PCR o equivalente.
- 35 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nicho tumoral es hueso o médula ósea.

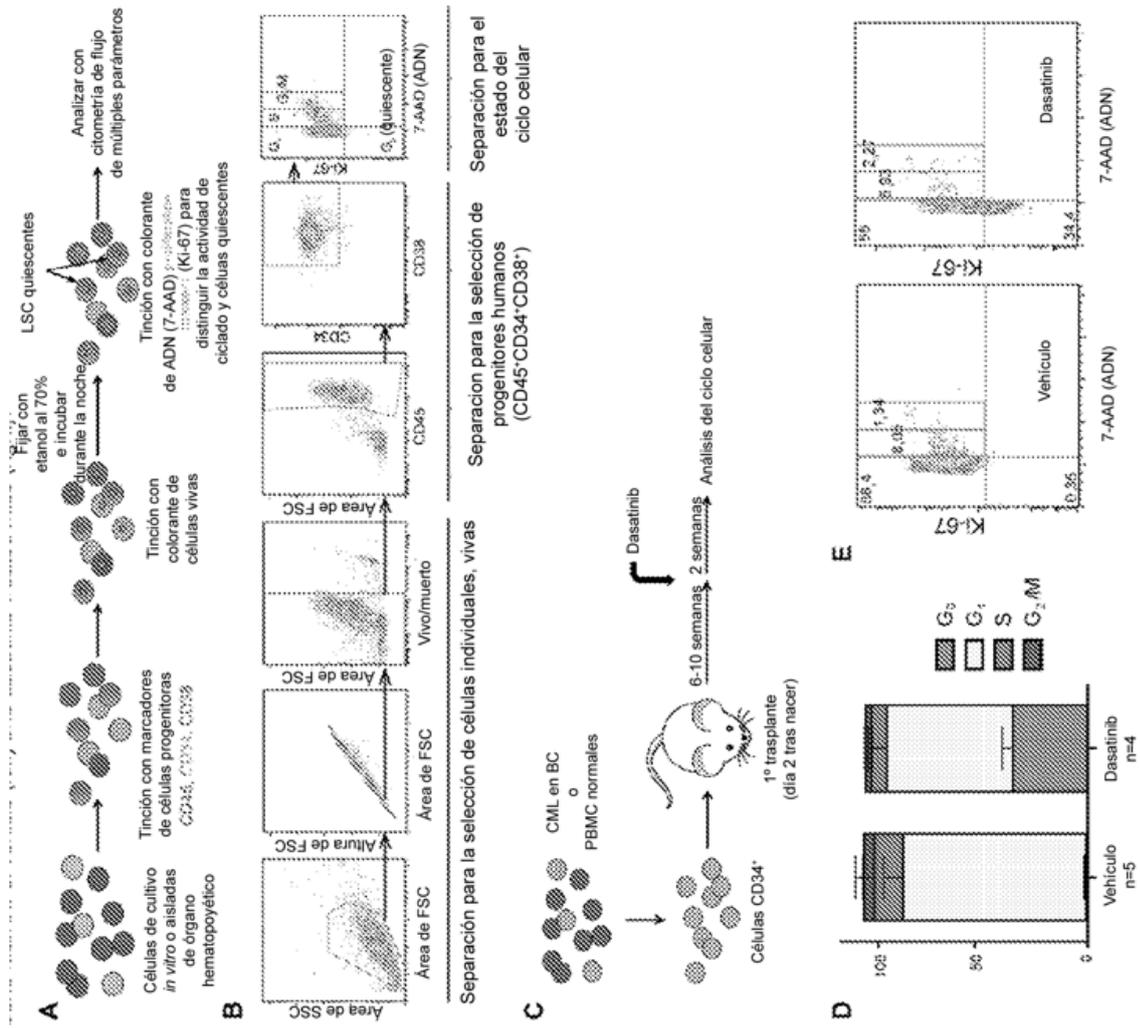


Figura 1

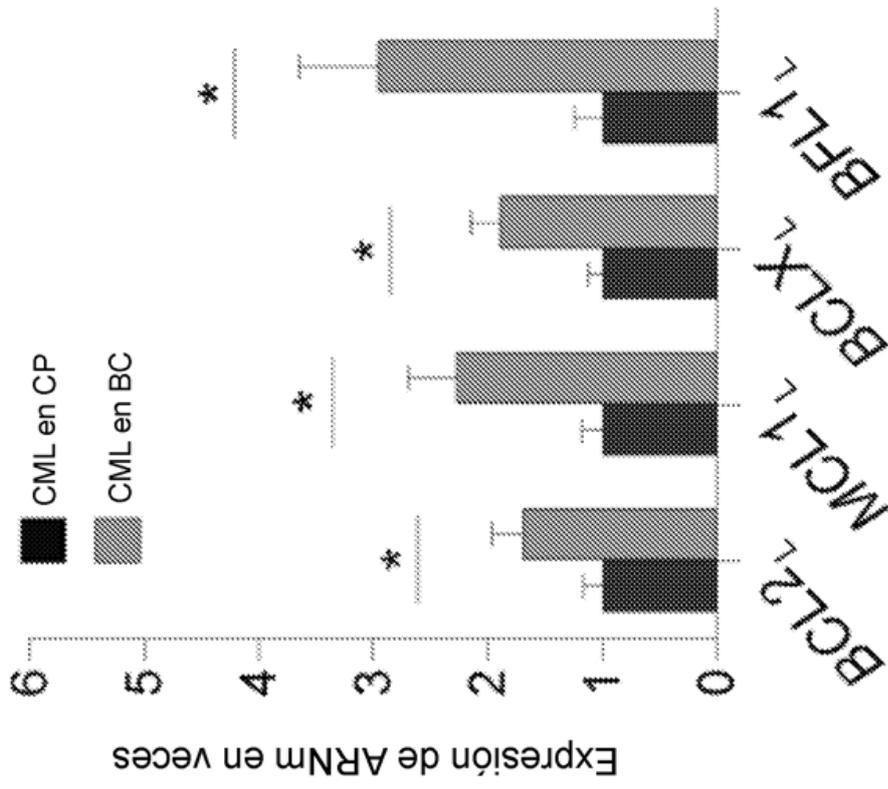


Figura 2

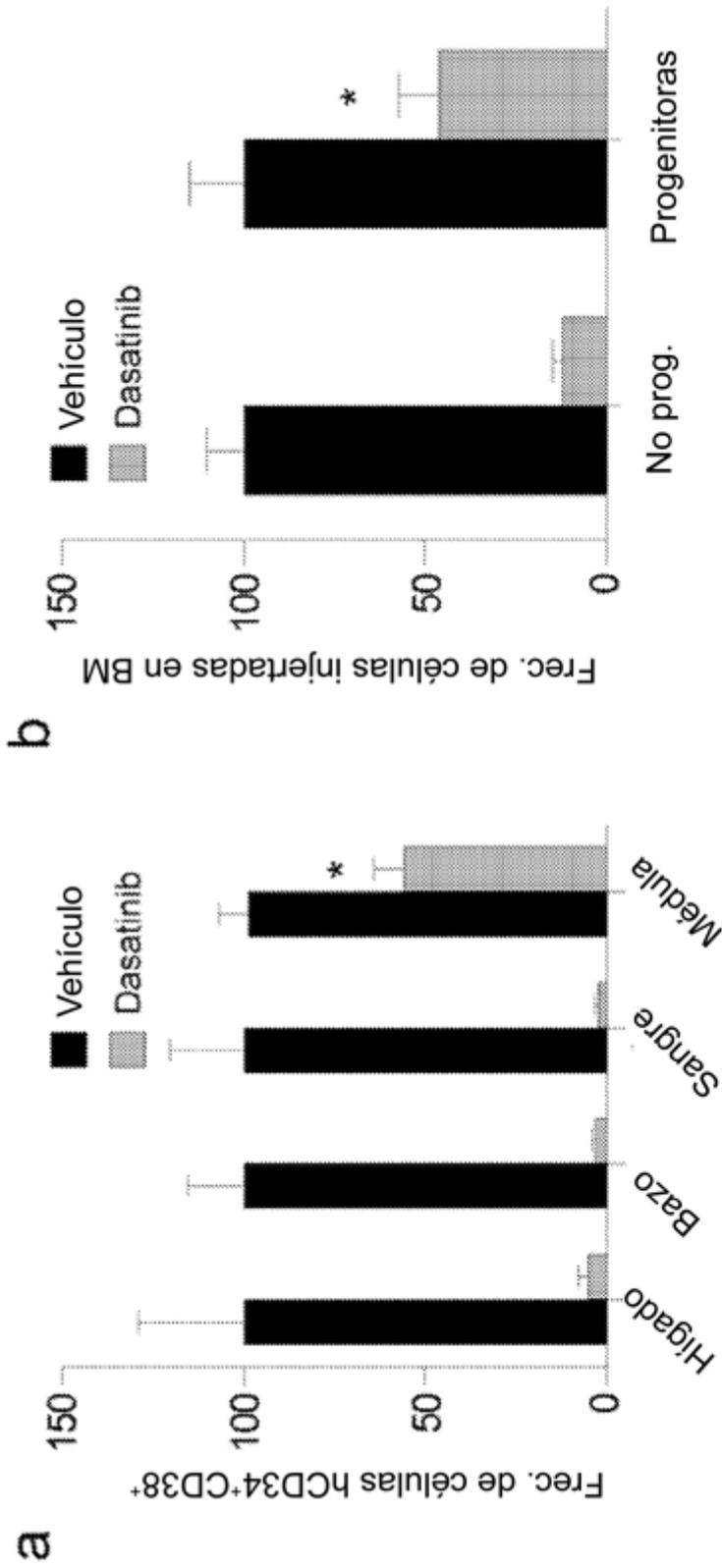


Figura 3

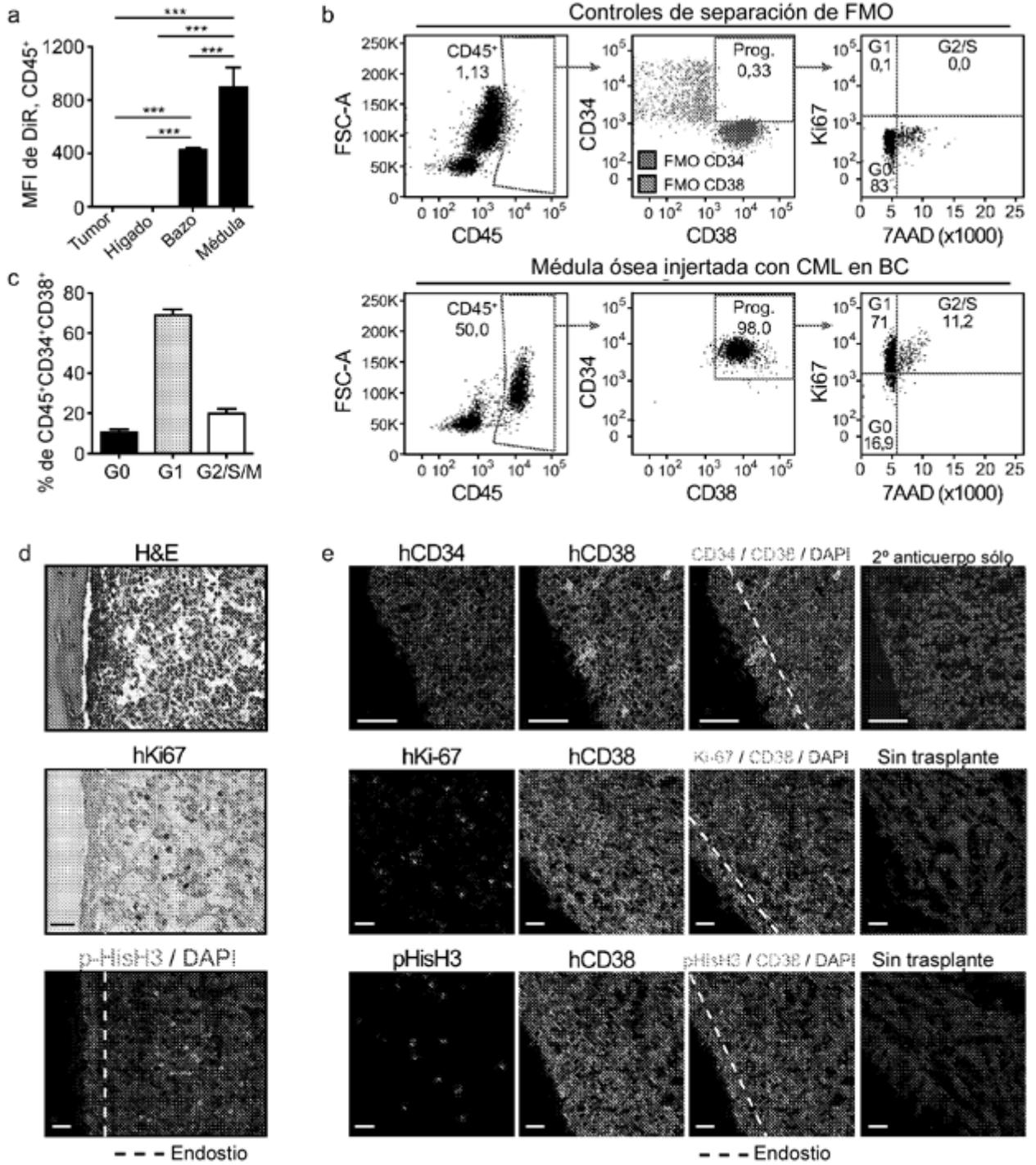


Figura 4

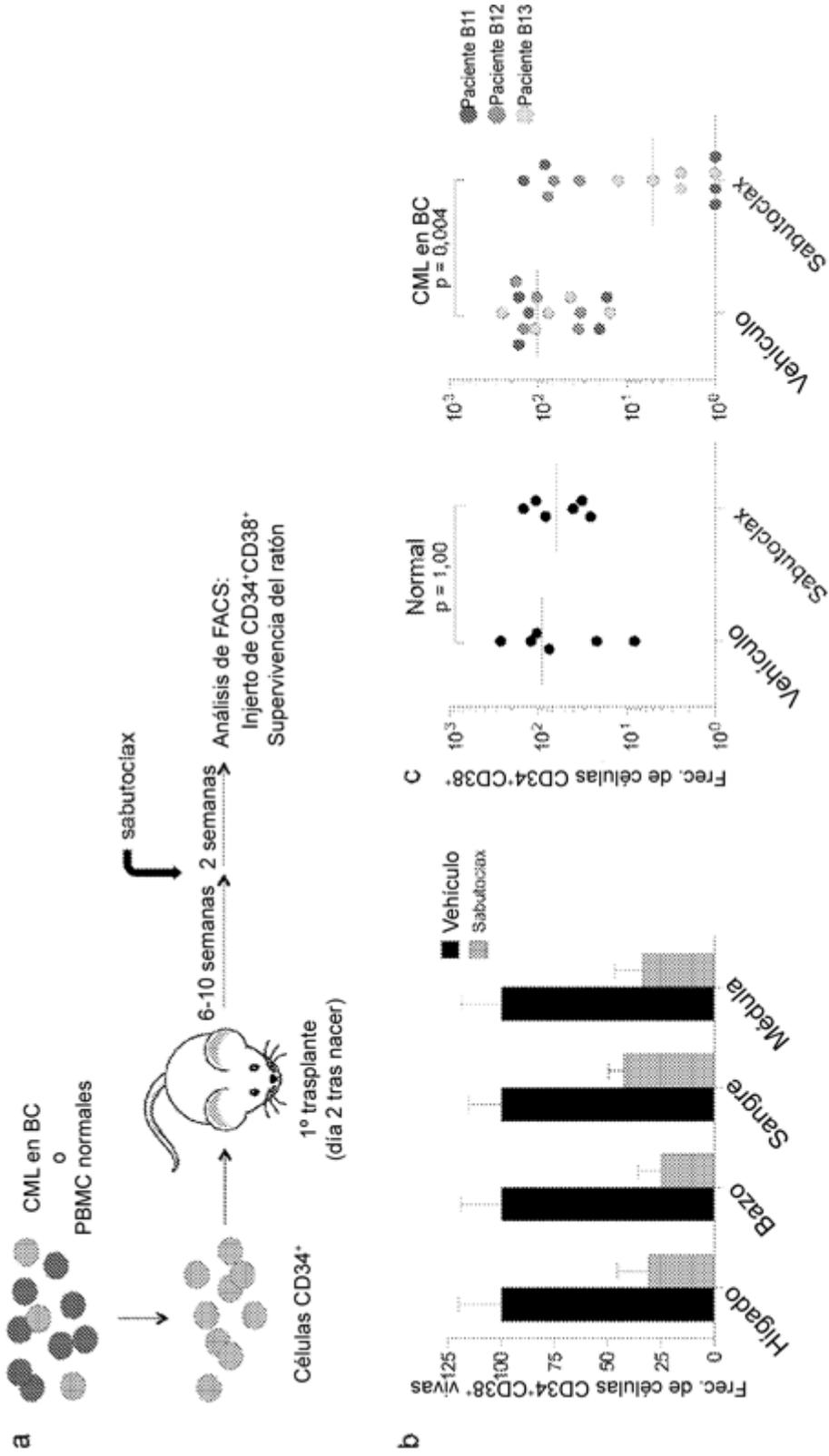


Figura 5

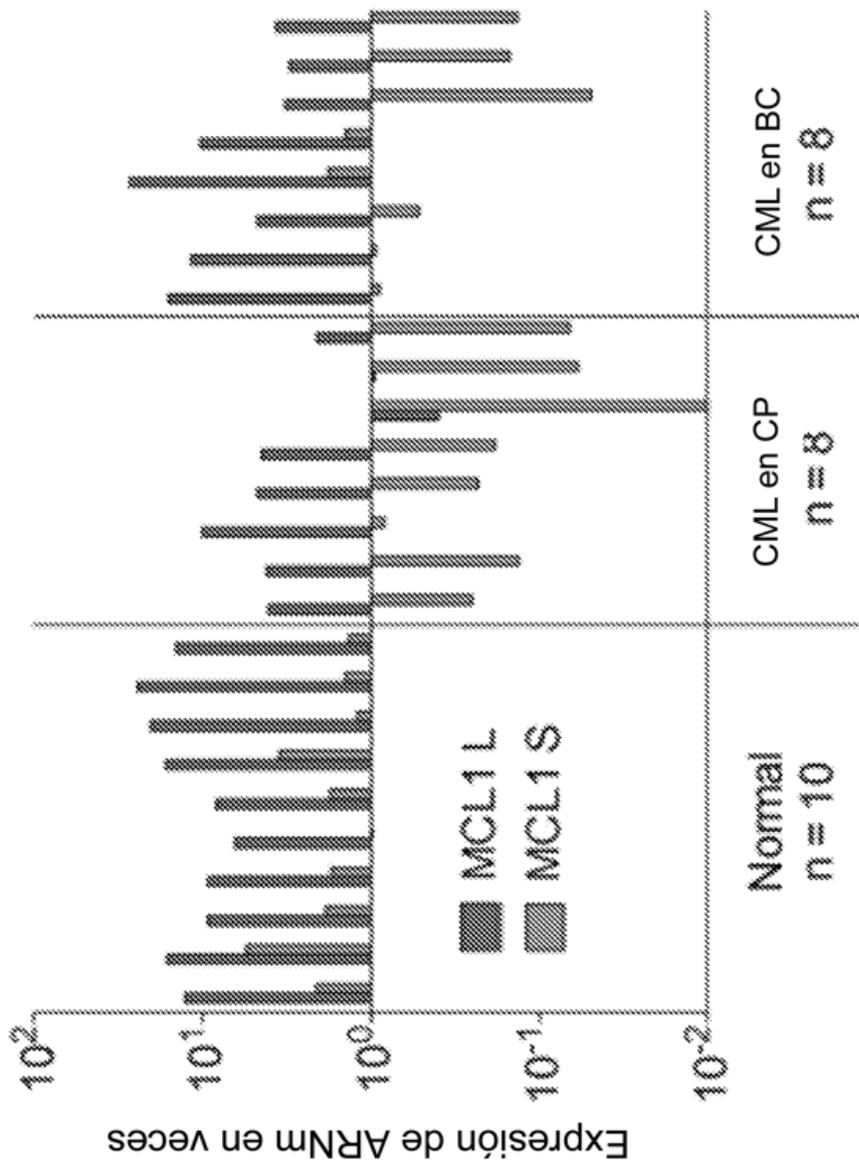


Figura 6

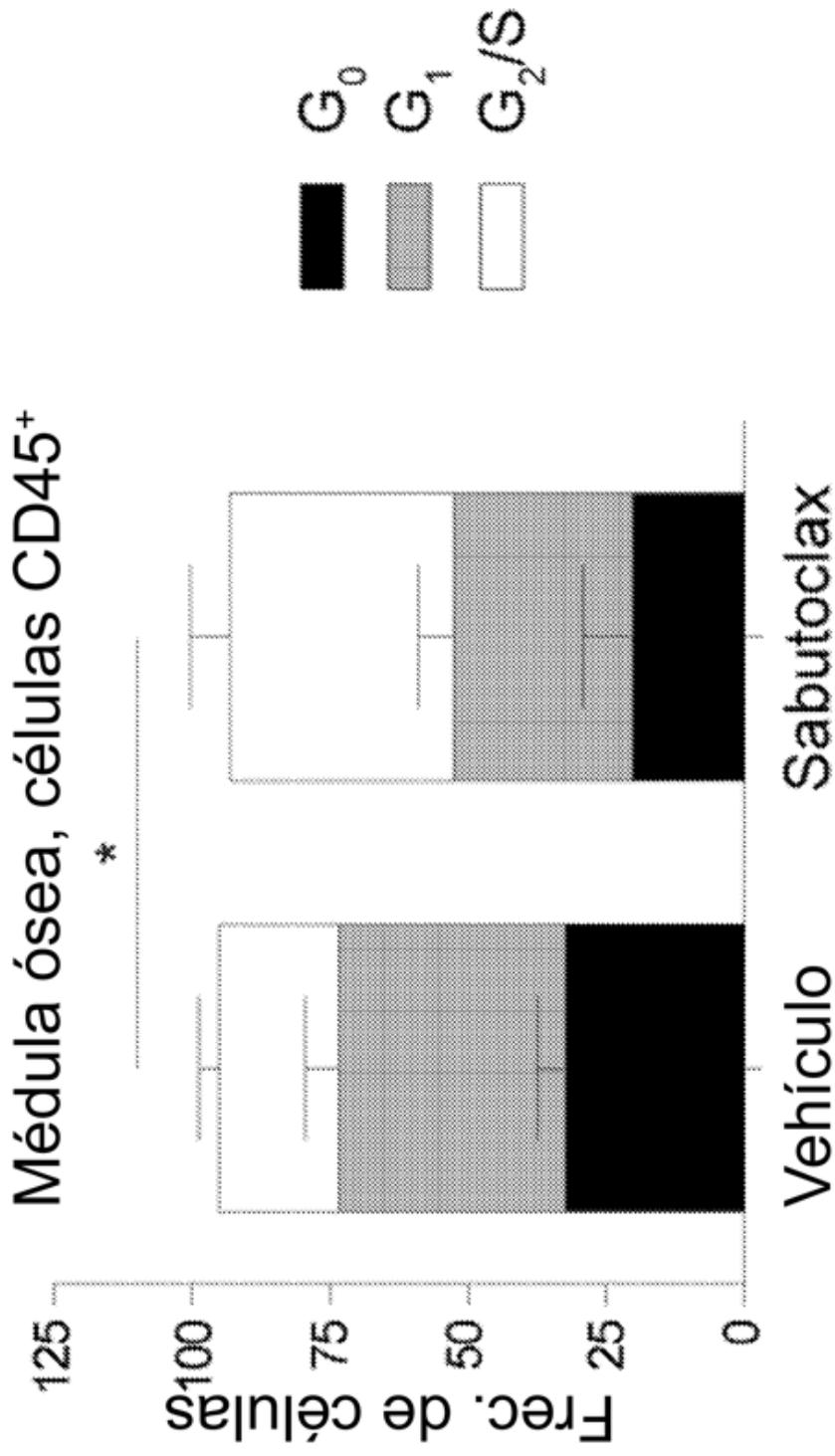


Figura 7

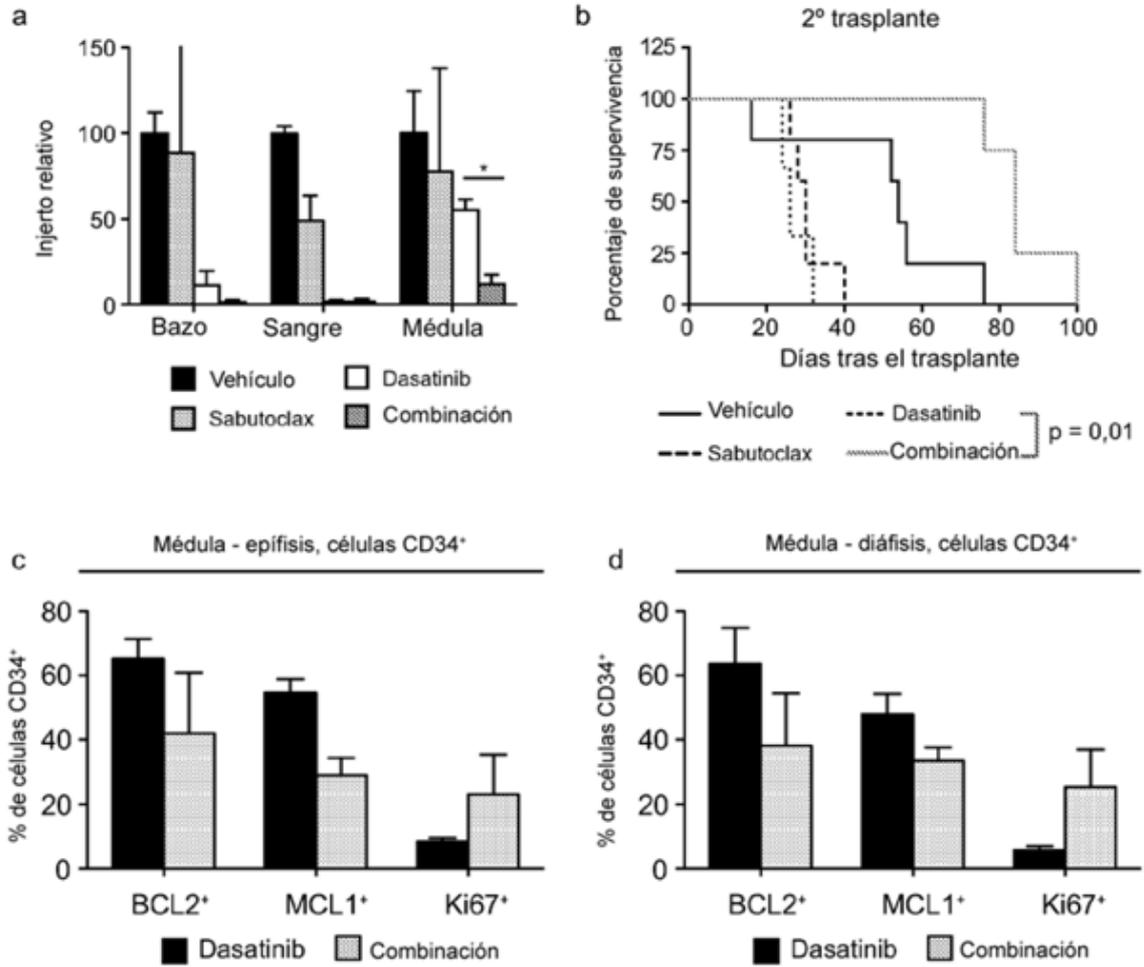


Figura 8