

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 085**

51 Int. Cl.:

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>G01N 33/574</b> | (2006.01) |
| <b>C12Q 1/68</b>   | (2008.01) |
| <b>C07K 16/28</b>  | (2006.01) |
| <b>G01N 33/50</b>  | (2006.01) |
| <b>C12N 5/09</b>   | (2010.01) |
| <b>C12N 5/00</b>   | (2006.01) |
| <b>A61K 39/00</b>  | (2006.01) |
| <b>C07K 16/30</b>  | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2009** **E 15198767 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 3043181**

54 Título: **Marcadores de células madre de leucemia mieloide aguda**

30 Prioridad:

**15.01.2008 US 11324 P**

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

**25.11.2020**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)  
Office of the General Counsel, Building 170, Third  
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386  
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**WEISSMAN, IRVING, L. y  
MAJETI, RAVINDRA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 796 085 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

Marcadores de células madre de leucemia mieloide aguda

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0001] La investigación del cáncer básica se ha centrado en la identificación de los cambios genéticos que conducen al cáncer. Esto ha llevado a importantes avances en nuestra comprensión de las vías moleculares y bioquímicas que están involucradas en la tumorigénesis y la transformación maligna. Sin embargo, nuestra comprensión de la biología celular se ha retrasado. Aunque se pueden predecir los efectos de mutaciones particulares en la proliferación y supervivencia de las células modelo, como los fibroblastos o las líneas celulares, los efectos de tales mutaciones en las células reales involucradas en cánceres específicos son en gran medida suposiciones.

15 [0002] Un tumor puede ser visto como un órgano aberrante iniciado por una célula de cáncer tumorigénica que adquirió la capacidad para la proliferación indefinida a través de mutaciones acumuladas. En esta visión de un tumor como órgano anormal, los principios de la biología normal de las células madre pueden aplicarse para comprender mejor cómo se desarrollan los tumores. Muchas observaciones sugieren que las analogías entre las células madre normales y las células tumorigénicas son apropiadas. Tanto las células madre normales como las células tumorigénicas tienen un gran potencial proliferativo y la capacidad de dar lugar a nuevos tejidos (normales o anormales). Tanto los tumores como los tejidos normales están compuestos de combinaciones heterogéneas de células, con diferentes características fenotípicas y diferentes potenciales proliferativos.

20 [0003] Debido a que la mayoría de los tumores tienen un origen clonal, la célula cancerígena tumorigénica original da origen a progenie fenotípicamente diversa, que incluye células cancerosas con potencial proliferativo indefinido, así como células cancerosas con potencial proliferativo limitado o nulo. Esto sugiere que las células cancerosas tumorigénicas se someten a procesos que son análogos a la autorrenovación y diferenciación de las células madre normales. Las células tumorigénicas pueden considerarse células madre cancerosas que se someten a un proceso de organogénesis aberrante y mal regulado, análogo a lo que hacen las células madre normales. Aunque parte de la heterogeneidad en los tumores surge como resultado de la mutagénesis continua, es probable que la heterogeneidad también surja a través de la diferenciación aberrante de las células cancerosas.

25 [0004] Está bien documentado que muchos tipos de tumores contienen células cancerosas con fenotipos heterogéneos, lo que refleja los aspectos de la diferenciación que se produce normalmente en los tejidos de los que surgen los tumores. La expresión variable de marcadores de diferenciación normales por las células cancerosas en un tumor sugiere que parte de la heterogeneidad en los tumores surge como resultado de la diferenciación anómala de las células tumorales. Ejemplos de esto incluyen la expresión variable de marcadores mieloides en la leucemia mieloide crónica, la expresión variable de marcadores neuronales dentro de tumores neuroectodérmicos periféricos y la expresión variable de proteínas de la leche o el receptor de estrógenos dentro del cáncer de mama.

30 [0005] Primero se documentó ampliamente para la leucemia y el mieloma múltiple que solo un pequeño subconjunto de células cancerosas es capaz de una proliferación extensa. Debido a que las diferencias en la clonogenicidad entre las células leucémicas reflejaban las diferencias en la clonogenicidad entre las células hematopoyéticas normales, las células leucémicas clonogénicas se describieron como células madre leucémicas. También se ha demostrado para los cánceres sólidos que las células son fenotípicamente heterogéneas y que solo una pequeña proporción de las células son clonogénicas en cultivo e *in vivo*. Al igual que en el contexto de las células madre leucémicas, estas observaciones llevaron a la hipótesis de que solo unas pocas células cancerosas son en realidad tumorigénicas y que estas células tumorigénicas actúan como células madre cancerosas.

35 [0006] En apoyo de esta hipótesis, estudios recientes han demostrado que, de forma similar a la leucemia y otras neoplasias hematológicas, se pueden aislar poblaciones tumorigénicas y no tumorigénicas de células de cáncer de mama en función de su expresión de marcadores de superficie celular. En muchos casos de cáncer de mama, solo una pequeña subpoblación de células tenía la capacidad de formar nuevos tumores. Este trabajo apoya firmemente la existencia de CMC en el cáncer de mama. Se ha encontrado evidencia adicional de la existencia de células madre cancerosas que se presentan en tumores sólidos en tumores malignos del sistema nervioso central (SNC). Utilizando técnicas de cultivo similares a las utilizadas para cultivar células madre neuronales normales, se ha demostrado que los tumores malignos del SNC neuronales contienen una pequeña población de células cancerosas que son clonogénicas *in vitro* e inician tumores *in vivo*, mientras que las células restantes en el tumor no tienen estas propiedades.

40 [0007] Las células madre se definen como células que tienen la capacidad de perpetuarse a través de la autorrenovación y para generar células maduras de un tejido particular a través de la diferenciación. En la mayoría de los tejidos, las células madre son raras. Como resultado, las células madre deben identificarse prospectivamente y purificarse cuidadosamente para estudiar sus propiedades. Quizás la propiedad más importante y útil de las células madre es la de la autorrenovación. A través de esta propiedad, se pueden encontrar paralelismos sorprendentes entre las células madre y las células cancerosas: los tumores a menudo pueden originarse a partir de la transformación de células madre normales, vías de señalización similares pueden regular la autorrenovación en células madre y células

cancerosas, y los cánceres pueden comprender células raras con potencial indefinido de autorrenovación que impulsa la tumorigénesis.

5 [0008] La presencia de células madre de cáncer tiene profundas implicaciones para la terapia del cáncer. En la actualidad, todas las células cancerosas fenotípicamente diversas en un tumor se tratan como si tuvieran un potencial proliferativo ilimitado y puedan adquirir la capacidad de hacer metástasis. Sin embargo, durante muchos años, se ha reconocido que se pueden detectar pequeñas cantidades de células cancerosas diseminadas en sitios distantes de los tumores primarios en pacientes que nunca manifiestan enfermedad metastásica. Una posibilidad es que la vigilancia inmune sea altamente efectiva para matar las células cancerosas diseminadas antes de que puedan formar un tumor detectable. Otra posibilidad es que la mayoría de las células cancerosas carecen de la capacidad de formar un tumor nuevo tal que solo la diseminación de células madre de cáncer raras puede provocar enfermedad metastásica. Si es así, el objetivo del tratamiento debe ser identificar y matar a esta población de células madre de cáncer.

15 [0009] La identificación prospectiva y el aislamiento de células madre de cáncer permitirá la identificación más eficiente de los marcadores de diagnóstico y dianas terapéuticas expresadas por las células madre. Las terapias existentes se han desarrollado en gran medida contra la población masiva de células tumorales, porque las terapias se identifican por su capacidad para reducir la masa tumoral. Sin embargo, debido a que la mayoría de las células dentro de un cáncer tienen un potencial proliferativo limitado, la capacidad de reducir un tumor refleja principalmente la capacidad de matar estas células. Las terapias que se dirigen más específicamente contra las células madre del cáncer pueden dar como resultado respuestas más duraderas y curas de tumores metastásicos.

25 [0010] La hematopoyesis avanza a través de una jerarquía de desarrollo organizada iniciada por células madre hematopoyéticas (HSC) que dan lugar a progenitores progresivamente más comprometidos y eventualmente a células sanguíneas diferenciadas terminalmente (Bryder et al., 2006). Aunque el concepto de HSC no era nuevo, no fue hasta 1988 que se demostró que esta población podía aislarse prospectivamente de la médula ósea del ratón sobre la base de marcadores de la superficie celular mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Spangrude et al., 1988). Desde entonces, el inmunofenotipo de superficie del HSC de ratón se ha vuelto cada vez más refinado, de modo que el HSC funcional puede aislarse con una sensibilidad exquisita, lo que resulta en una pureza de 1 en 1,3 células (Kiel et al., 2005). Si bien nuestra capacidad para aislar prospectivamente HSC de ratón ha mejorado dramáticamente en los últimos 20 años, nuestra comprensión de los primeros eventos en el sistema hematopoyético humano va muy por detrás.

35 [0011] Las células madre de cáncer se tratan en, p. ej., Pardal et al. (2003) Nat Rev Cancer 3, 895-902; Reya y col. (2001) Nature 414, 105-11; Bonnet y Dick (1997) Nat Med 3, 730-7; Al-Hajj y col. (2003) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100, 3983-8; Dontu y col. (2004) Breast Cancer Res 6, R605-15; Singh y col. (2004) Nature 432, 396-401.

40 [0012] US 2004/213792 describe un método para inhibir la activación celular por el factor de crecimiento de tipo insulina 1. Hosen y col. (2007) PNAS 104 (26): 11008-11013 informa que CD96 es un marcador específico de células madre leucémicas en la leucemia mieloide aguda humana. Clarke y col. (2006) Cancer Res 66 (19): 9339-9344 describe las células madre del cáncer. El documento US 2007/287163 describe métodos para el diagnóstico de leucemia mieloide aguda. El documento US 6,733,743 describe métodos para dañar las células progenitoras de cáncer hematológico y los compuestos relacionados con los mismos. El documento US 6,491,917 describe una composición de anticuerpos para eliminar muestras de sangre y médula ósea de pacientes con LMC. Martin-Subero y col. (2001) describe la amplificación de los genes *ERBB2*, *RARA* y *TOP2A* en un síndrome mielodisplásico que se transforma en leucemia mieloide aguda.

50 [0013] La identificación de una jerarquía de progenitores hematopoyéticos multipotentes en sangre de cordón humano, incluyendo las células progenitoras multipotentes, se pueden encontrar en Majeti et al. (2007) Cell Stem Cell 1 (6): 635-45, que describe marcadores que identifican los progenitores multipotentes.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

55 [0014] La invención proporciona un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 humano que bloquea la interacción de CD47 con SIRP $\alpha$ , para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) humana mediante la estimulación de la fagocitosis de células madre leucémicas LMA (CML) por macrófagos, en donde el anticuerpo dirigido contra CD47 humano se usa en combinación con uno o más anticuerpos monoclonales adicionales dirigidos contra uno o más de los siguientes marcadores: CD96, CD97, CD99, CD180, PTHR2, HAVCR2, CD123, CD44 y CD33.

60 [0015] En este documento se proporcionan marcadores de células madre de leucemia mieloide aguda (CMLMA). Los marcadores son polinucleótidos o polipéptidos que se expresan diferencialmente en CMLMA en comparación con las células homólogas normales. Los usos de los marcadores incluyen el uso como dianas para anticuerpos terapéuticos o ligandos; como dianas para el desarrollo de fármacos y para la identificación o selección de poblaciones de células CMLMA.

65 [0016] Los marcadores CMLMA son útiles como dianas de los anticuerpos monoclonales terapéuticos para el

tratamiento de los pacientes con *de novo*, recaída, o leucemia mieloide aguda refractaria. Dichos anticuerpos monoclonales también son útiles en el tratamiento de afecciones preleucémicas, como los síndromes mielodisplásicos (SMD) y los trastornos mieloproliferativos (MPD), que incluyen: leucemia mielógena crónica, policitemia vera, trombocitosis esencial, mielofibrosis agnógena y metaplasia mieloide, y otros. Los anticuerpos incluyen anticuerpos libres y fragmentos de unión a antígeno derivados de los mismos, y conjugados, p. ej., anticuerpos pegilados, fármacos, radioisótopos o conjugados de toxinas, y similares.

**[0017]** En algunos casos, las combinaciones de anticuerpos monoclonales se utilizan en el tratamiento de LMA humano o condiciones preleucémica. En un caso, un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47, por ejemplo un anticuerpo que bloquea la interacción de CD47 con SIRP $\alpha$ , se combina con anticuerpos monoclonales dirigidos contra uno o más marcadores CMLMA adicionales, p. ej., CD96, CD97, CD99, CD180, PTHR2, HAVCR2 (también denominado TIM3) y similares, cuyas composiciones pueden ser sinérgicas para mejorar la fagocitosis y la eliminación de CML de LMA en comparación con el uso de anticuerpos individuales.

**[0018]** Los marcadores CMLMA son útiles como dianas de los anticuerpos monoclonales para su uso en purga *ex vivo* de productos de células madre autólogas (sangre periférica o médula ósea movilizada) para su uso en el trasplante autólogo para los pacientes con leucemia mieloide aguda o las condiciones pre-leucémicas esbozadas arriba. Las combinaciones de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de la superficie celular específicas de CML de LMA, como se describió anteriormente, pueden ser sinérgicas para eliminar el CML.

**[0019]** Los marcadores CMLMA son útiles en aplicaciones de diagnóstico clínico que incluyen, sin limitación, el diagnóstico primario de LMA o condiciones pre-leucémicas de la sangre y/o muestras de médula ósea, la evaluación de la implicación leucémica de los fluidos corporales cefalorraquídeos y otros, el seguimiento de progresión de la enfermedad a intervalos y monitoreo del estado mínimo residual de la enfermedad.

**[0020]** Como una alternativa a los anticuerpos monoclonales, los ligandos de los marcadores CMLMA, ya sea como agentes únicos o en combinación, pueden usarse para dirigirse a ellos en LMA o las condiciones pre-leucémicas descritas anteriormente. Los ligandos pueden ser libres o conjugados, para administración directa a pacientes o para purga *ex vivo* de productos de células madre autólogas. Algunas moléculas específicas y sus ligandos incluyen, sin limitación, la proteína de fusión CD155-Fc que se une a CD96; TIP39 que se une a PTHR2; Galectina-9 que se une a HAVCR2.

**[0021]** Las células CMLMA pueden prospectivamente ser aisladas o identificadas a partir de muestras de tumor primario, y poseen las propiedades únicas de las células madre cancerosas en ensayos funcionales para células madre de cáncer de auto-renovación y diferenciación.

**[0022]** En algunos casos, los métodos se describen en el presente documento para la detección, clasificación o estadificación clínica de leucemias mieloides agudas de acuerdo con las células madre que están presentes en la leucemia, donde un mayor número de células madre son indicativas de un fenotipo de cáncer más agresivo. La estadificación es útil para el pronóstico y el tratamiento. En algunos casos, una muestra de tumor se analiza por histoquímica, que incluye inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y similares, para detectar la presencia de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> que expresan uno o más marcadores CMLMA proporcionados aquí. La presencia de tales células indica la presencia de CMLMA.

**[0023]** En otro ejemplo, se dan a conocer métodos para el aislamiento de CMLMA, que comprende contactarse una población de células candidatas con una unión específica reactiva para uno o más de los marcadores CMLMA proporcionados en este documento, y seleccionar las células que se han unido al (a los) reactivo(s). Las células pueden seleccionarse además como CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>. Las células son útiles para la evaluación experimental y como fuente de linaje y productos específicos de células, incluidas las especies de ARNm útiles para identificar genes expresados específicamente en estas células y como objetivos para el descubrimiento de factores o moléculas que pueden afectarlos. CMLMA se puede usar, p. ej., en un método de selección de un compuesto para un efecto en las células. Esto implica combinar el compuesto con la población celular de la divulgación, y luego determinar cualquier efecto modulador resultante del compuesto. Esto puede incluir el examen de las células para determinar su viabilidad, toxicidad, cambio metabólico o un efecto sobre la función celular. El fenotipo de CMLMA descrito en este documento proporciona un medio para predecir la progresión de la enfermedad, la recaída y el desarrollo de resistencia a los medicamentos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0024]**

Figura 1: *Expresión de genes diferencial entre CML de LMA y médula ósea normal HSC y MPP* (A) Mapas de calor demostrando genes que se encuentran diferencialmente expresadas al menos 2 veces entre la médula ósea HSC (n=4) y CML de LMA (n=9) o médula ósea MPP (n=4) y CML de LMA (n=9). La expresión relativa a la mediana está indicada para genes con  $p < 0,05$  y un FDR de 5%. (B) Lista seleccionada de proteínas transmembranas que se encuentran al menos 2 veces más altamente expresadas en CML de LMA

que HSC de MPP. NS: no significativo.

Figura 2. CD47 se expresa más altamente en CML de LMA. La sangre periférica movilizada (MPB) HSC y CML de LMA se examinaron para la expresión de CD47 por citometría de flujo. (A) Gráficos representativos de citometría de flujo que indican la expresión de CD47 en relación con un control de isotipo. (B) Resumen de la expresión de CD47 en todas las muestras analizadas, con los medios indicados.

Figura 3: El anticuerpo anti-CD47 estimula la fagocitosis in vitro de macrófagos de la LMA humana primaria CML. Los CML de LMA se purificaron mediante FACS a partir de dos muestras de LMA humanas primarias, marcadas con el colorante fluorescente CFSE e incubadas con macrófagos derivados de médula ósea de ratón, ya sea en presencia de un control de isotipo (A) o anticuerpo anti-CD47 (B). Estas células se evaluaron mediante microscopía de inmunofluorescencia para detectar la presencia de CML marcado con fluorescencia dentro de los macrófagos. (C) El índice fagocítico se determinó para cada condición calculando el número de células ingeridas por 100 macrófagos.

Figura 4. El anticuerpo anti-CD47 estimula la fagocitosis de macrófagos in vitro de CML de LMA humana primaria. Los LSL de LMA se purificaron mediante FACS a partir de dos muestras de LMA humanas primarias y se marcaron con el colorante fluorescente CFSE. Estas células se incubaron con macrófagos derivados de médula ósea de ratón, ya sea en presencia de un control de isotipo compatible (izquierda) o anticuerpo anti-CD47 (derecha). Los macrófagos se cosecharon, se tiñeron con un anticuerpo anti-macrófago de ratón marcado con fluorescencia y se analizaron por citometría de flujo. Los eventos mMac+CFSE+ doble positivo identifican macrófagos que tienen CML fagocitados etiquetados con CFSE. (A, B) dos muestras primarias independientes de CML de LMA.

Figura 5. El anticuerpo anti-CD47 inhibe el injerto in vivo de LMA humana primaria. Dos muestras de LMA humanas primarias no se trataron (control, n = 3) o se recubrieron con anticuerpo anti-CD47 humano (anti-CD47, n = 6) antes del trasplante en ratones NOG recién nacidos. 13 semanas después, se sacrificaron los ratones y se analizó la médula ósea para detectar la presencia de células de leucemia mieloide CD45+CD33+ humana mediante citometría de flujo.

Figura 6A-B: Expresión de CD99 en CML de LMA en comparación con HSC normal. Se examinó la expresión de CD99 en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y CML de LMA humana de novo (n=7). Se muestran histogramas representativos de expresión de CD99 en HSC y CML (izquierda) y un resumen de la intensidad de fluorescencia media (IFM) normalizada de todas las muestras (derecha). La expresión media de CD99 aumentó 5,6 veces en CML de LMA en comparación con HSC (P=0,05).

Figura 7A-B: Expresión de CD97 en CML de LMA en comparación con HSC normal. La expresión de CD97 se examinó en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y CML de LMA humana de novo (n=7). Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD97 en HSC y CML (izquierda) y un resumen de la intensidad de fluorescencia media normalizada (IFM) de todas las muestras (derecha). La expresión media de CD97 aumentó 7,9 veces en CML de LMA en comparación con HSC (P=0,03).

Figura 8A-B: Expresión de CD180 en CML de LMA en comparación con HSC normal. Se examinó la expresión de CD180 en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y CML de LMA humana de novo (n=7). Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD180 en HSC y CML (izquierda) y un resumen de la intensidad de fluorescencia media normalizada (IFM) de todas las muestras (derecha). La expresión media de CD180 aumentó 60 veces en CML de LMA en comparación con HSC (P=0,20).

Figura 9A-B: Expresión TIM3 en CML de LMA en comparación con HSC normal. La expresión de TIM3 se examinó en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y CML de LMA humana de novo (n=14). Se muestran histogramas representativos de la expresión de TIM3 en HSC y CML (izquierda) y un resumen de la intensidad de fluorescencia media normalizada (IFM) de todas las muestras (derecha). La expresión media de TIM3 aumentó 9 veces en CML de LMA en comparación con HSC (P=0,01).

Figura 10: Expresión de PTH2R en CML de LMA en comparación con HSC normal. La expresión de PTH2R se examinó en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y CML de LMA humana de novo (n=9). La expresión se determinó por qRT-PCR y se expresó con respecto a la beta-actina como control. La expresión media de PTH2R aumentó 21 veces en CML de LMA en comparación con HSC (p<0,001).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0025]** Esta divulgación identifica polinucleótidos, así como polipéptidos codificados por los mismos, que están diferencialmente expresados en células madre leucémicas mieloides agudas (CMLMA). Se proporcionan métodos en los que estos polinucleótidos y polipéptidos, que pueden denominarse colectivamente marcadores CMLMA, se usan para detectar, evaluar y reducir el crecimiento de células cancerosas. Los métodos pueden usar uno o una combinación de marcadores, donde una combinación puede incluir 2, 3 o más marcadores, y en algunos casos incluirá CD47 en combinación con 1, 2 o más marcadores. Los marcadores descritos encuentran uso en la prevención, tratamiento, detección o investigación de afecciones leucémicas y preleucémicas.

**[0026]** Los marcadores de la descripción, en algunos casos, se expresan en la superficie celular CMLMA. En algunos casos, los marcadores se expresan como un nivel de al menos 2 veces el nivel de expresión de una célula homóloga no transformada, p. ej., una célula madre hematopoyética humana, y/o una célula progenitora multipotente hematopoyética humana, donde la expresión puede determinarse como el nivel de transcripción, acumulación de ARNm y/o acumulación de proteínas. En otros casos, los marcadores se expresan como un nivel de al menos 3X, al menos 4X, al menos 5X, al menos 10X, al menos 20X o más, que el nivel de expresión de una célula homóloga no

transformada.

**[0027]** En el presente documento se describen métodos de uso de los marcadores descritos en el presente documento en el diagnóstico de cáncer, clasificación y tratamiento de condiciones leucémicas y pre-leucémicas de acuerdo con los perfiles de expresión. Los métodos son útiles para detectar CMLMA, facilitar el diagnóstico de LMA y la gravedad del cáncer (p. ej., grado tumoral, carga tumoral y similares) en un sujeto, facilitando la determinación del pronóstico de un sujeto y evaluando la capacidad de respuesta del sujeto a la terapia. Los métodos de detección de la divulgación pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*, en células aisladas, o en tejidos completos o un fluido corporal, p. ej., muestras de biopsia de ganglios linfáticos, sangre y similares.

**[0028]** Como se usa en el presente documento, los términos "un gen que se expresa diferencialmente en una célula madre de cáncer", y "un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula madre de cáncer", se utilizan indistintamente en la presente memoria, y en general se refieren a un polinucleótido que representa o corresponde a un gen que se expresa diferencialmente en una célula madre cancerosa cuando se compara con una célula del mismo tipo de célula que no es cancerosa, p. ej., el ARNm se encuentra en niveles de al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 50% a aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces o al menos aproximadamente 50 veces o más, diferentes (p. ej., más altos o más bajos). La comparación se puede hacer entre CMLMA y las células homólogas normales, una célula madre hematopoyética humana (HSC), que incluye, sin limitación, células que tienen el fenotipo Lin<sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup></sup>; o el fenotipo Lin<sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup></sup> y una célula progenitora multipotente hematopoyética humana (MPP), que incluye sin limitación células que tienen el fenotipo Lin<sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup></sup>; o el fenotipo Lin<sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup></sup>. El término "un marcador de polipéptido para una célula madre cancerosa" se refiere a un polipéptido codificado por un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula madre cancerosa.

**[0029]** En algunos casos, los marcadores se demuestran por citometría de flujo para estar presente en una mayoría de CMLMA, cuando se compara con HSC humana o MPP, como se define anteriormente. Dichos marcadores incluyen, sin limitación, CD47, CD96, CD97 y CD99.

**[0030]** En otros casos, los marcadores están ausentes en HSC humana o MPP humana, pero son altamente expresados en CMLMA. Tales marcadores incluyen, sin limitación, los indicados en la Tabla 1.

**[0031]** En otros casos, los marcadores se expresan diferencialmente en CMLMA, en comparación con HSC humana o MPP. Tales marcadores incluyen, sin limitación, los indicados en la Tabla 1.

**[0032]** Un polinucleótido o secuencia que corresponde a, o representa un gen significa que al menos una porción de una secuencia del polinucleótido está presente en el gen o en el producto génico de ácido nucleico (p. ej., ARNm o ADNc). Un ácido nucleico sujeto también puede ser "identificado" por un polinucleótido si el polinucleótido corresponde o representa al gen. Los genes identificados por un polinucleótido pueden tener toda o una parte de la secuencia de identificación totalmente presente dentro de un exón de una secuencia genómica del gen, o diferentes partes de la secuencia del polinucleótido pueden estar presentes en diferentes exones (p. ej. la secuencia de polinucleótidos está presente en un ARNm, ya sea antes o después del empalme, que es un producto de expresión del gen). Una "secuencia de identificación" es un fragmento mínimo de una secuencia de nucleótidos contiguos que identifica o define de forma única una secuencia de polinucleótidos o su complemento.

**[0033]** El polinucleótido puede representar o corresponder a un gen que está modificado en una célula madre de cáncer (CMC) con respecto a una célula normal. El gen en el CMC puede contener una delección, inserción, sustitución o translocación en relación con el polinucleótido y puede tener secuencias reguladoras alteradas, o puede codificar un producto de gen variante de empalme, por ejemplo. El gen en el CMC puede modificarse mediante la inserción de un retrovirus endógeno, un elemento transponible u otro ácido nucleico natural o no natural.

**[0034]** Las secuencias de interés incluyen las establecidas en la Tabla 1, que se expresan diferencialmente en CMLMA con respecto a las células de contraparte normales.

**[0035]** También se proporcionan procedimientos para la optimización de la terapia, por primera clasificación, y en base a esa información, la selección de la terapia apropiada, la dosis, la modalidad de tratamiento, *etc.*, que optimiza el diferencial entre la entrega de un tratamiento antiproliferativo a las células diana indeseables, mientras se minimiza la toxicidad indeseable. El tratamiento se optimiza mediante la selección de un tratamiento que minimiza la toxicidad indeseable, al tiempo que proporciona una actividad antiproliferativa efectiva.

**[0036]** La invención encuentra uso en el tratamiento de leucemias mieloides agudas. Las leucemias agudas son leucemias que progresan rápidamente y se caracterizan por el reemplazo de la médula ósea normal por células blásticas de un clon que surge de la transformación maligna de una célula madre hematopoyética. Las leucemias agudas incluyen leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mielógena aguda (LMA). La LLA a menudo afecta al SNC, mientras que la leucemia monoblástica aguda afecta a las encías, y la LMA involucra colecciones localizadas

en cualquier sitio (sarcomas granulocíticos o cloromas). La LMA es la leucemia aguda más común que afecta a los adultos, y su incidencia aumenta con la edad. Si bien la LMA es una enfermedad relativamente rara en general, que representa aproximadamente el 1,2% de las muertes por cáncer en los Estados Unidos, se espera que su incidencia aumente a medida que envejece la población.

**[0037]** Los síntomas que se presentan son por lo general no específicos (p. ej., fatiga, fiebre, malestar, pérdida de peso) y reflejan el fracaso de la hematopoyesis normal. La anemia y la trombocitopenia son muy comunes (75 a 90%). El recuento de glóbulos blancos puede estar disminuido, normal o aumentado. Las células blásticas generalmente se encuentran en el frotis de sangre a menos que el recuento de glóbulos blancos disminuya notablemente. Las explosiones de LLA se pueden distinguir de las de LMA por estudios histoquímicos, citogenéticos, inmunofenotipaje y estudios de biología molecular. Además de los frotis con las manchas habituales, transferasa terminal, mieloperoxidasa, negro de Sudán B y esterasa específica e inespecífica.

**[0038]** El "diagnóstico" tal como se usa en el presente documento generalmente incluye la determinación de la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad o trastorno, la determinación de si un sujeto está actualmente afectado por una enfermedad o trastorno, el pronóstico de un sujeto afectado por una enfermedad o trastorno (p. ej., identificación de estados cancerosos, etapas de cáncer o capacidad de respuesta del cáncer a la terapia) y uso de terametría (p. ej., monitoreo de la condición de un sujeto para proporcionar información sobre el efecto o la eficacia de la terapia).

**[0039]** El término "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un organismo y se pueden utilizar en un ensayo de diagnóstico o de control. El término abarca muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de la misma y la progenie de los mismos. El término abarca muestras que han sido manipuladas de cualquier forma después de su adquisición, como por ejemplo con tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes. El término abarca una muestra clínica, y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido.

**[0040]** Los términos "tratamiento", "tratar", "tratado" y similares se usan en este documento para referirse generalmente a la obtención de un efecto deseado farmacológico y/o fisiológico. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El "tratamiento" tal como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad o síntoma ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero que aún no ha sido diagnosticado por tenerlo; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

**[0041]** Los términos "individual" "sujeto", "huésped" y "paciente", utilizados aquí de forma intercambiable, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el cual se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente seres humanos.

**[0042]** Una "célula huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo o una célula eucariota o línea celular cultivada como una entidad unicelular que puede ser, o ha sido, usada como receptor de un vector recombinante o de otros polinucleótidos de transferencia, e incluir la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Se entiende que la progenie de una sola célula puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN genómico o total como el padre original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

**[0043]** Los términos "cáncer", "neoplasma", "tumor", y "carcinoma", se utilizan indistintamente en este documento para referirse a las células que exhiben un crecimiento relativamente autónomo, de forma que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. En general, las células de interés para la detección o el tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (p. ej., benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. La detección de células cancerosas es de particular interés. El término "normal", como se usa en el contexto de "célula normal", se refiere a una célula de un fenotipo no transformado o que exhibe una morfología de una célula no transformada del tipo de tejido que se está examinando. El "fenotipo canceroso" generalmente se refiere a cualquiera de una variedad de fenómenos biológicos que son característicos de una célula cancerosa, fenómenos que pueden variar según el tipo de cáncer. El fenotipo canceroso se identifica generalmente por anomalías en, p. ej., el crecimiento o la proliferación celular (p. ej., crecimiento incontrolado o proliferación), la regulación del ciclo celular, célula movilidad, la interacción célula-célula, o la metástasis, etc.

**[0044]** "Diana terapéutica" se refiere a un gen o producto génico que, tras la modulación de su actividad (p. ej., mediante la modulación de la expresión, la actividad biológica y similares), puede proporcionar la modulación del fenotipo canceroso. Como se usa en todas partes, "modulación" se refiere a un aumento o una disminución en el fenómeno indicado (p. ej., la modulación de una actividad biológica se refiere a un aumento en una actividad biológica

o una disminución en una actividad biológica).

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

5 **[0045]** Leucemia mielocítica aguda (LMA, leucemia mielógena aguda; leucemia mieloide aguda). En la LMA, la transformación maligna y la proliferación incontrolada de una célula progenitora mieloide anormalmente diferenciada y de larga vida da como resultado un gran número circulante de formas sanguíneas inmaduras y el reemplazo de la médula normal por células malignas. Los síntomas incluyen fatiga, palidez, hematomas y sangrado fáciles, fiebre e infección; los síntomas de infiltración leucémica están presentes en solo alrededor del 5% de los pacientes (a menudo como manifestaciones cutáneas). El examen de frotis de sangre periférica y médula ósea es diagnóstico. El tratamiento incluye quimioterapia de inducción para lograr la remisión y quimioterapia posterior a la remisión (con o sin trasplante de células madre) para evitar recaídas.

15 **[0046]** La LMA tiene varios subtipos que se distinguen entre sí por la morfología, el inmunofenotipo y la citoquímica. Se describen cinco clases, basadas en el tipo de célula predominante, que incluyen mieloide, mieloide-monocítica, monocítica, eritroide y megacariocítica. La leucemia promielocítica aguda es un subtipo particularmente importante, que representa del 10 al 15% de todos los casos de LMA, que afecta a un grupo de edad más joven (mediana de edad de 31 años) y una etnia particular (hispanos), en donde el paciente se presenta comúnmente con un trastorno de la coagulación.

20 **[0047]** Las tasas de inducción de remisión varían del 50 al 85%. Según los informes, la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo ocurre en 20 a 40% de los pacientes y aumenta a 40 a 50% en pacientes más jóvenes tratados con trasplante de células madre.

25 **[0048]** Los factores pronósticos ayudan a determinar el protocolo y la intensidad del tratamiento; Los pacientes con características de pronóstico fuertemente negativas generalmente reciben formas de terapia más intensas, porque se cree que los beneficios potenciales justifican el aumento de la toxicidad del tratamiento. El factor pronóstico más importante es el cariotipo de células leucémicas; los cariotipos favorables incluyen t(15;17), t(8;21) e inv16 (p13; q22). Los factores negativos incluyen aumento de la edad, una fase mielodisplásica precedente, leucemia secundaria, recuento alto de glóbulos blancos y ausencia de varillas de Auer. La clasificación FAB o de la OMS por sí sola no predice la respuesta.

35 **[0049]** Intentos iniciales de terapia para inducir la remisión y difiere más de LLA en que LMA responde a menos medicamentos. El régimen de inducción básico incluye citarabina por infusión intravenosa continua o dosis altas durante 5 a 7 días; daunorubicina o idarubicina se administra por vía intravenosa durante 3 días durante este tiempo. Algunos regímenes incluyen 6-tioguanina, etopósido, vincristina y prednisona, pero su contribución no está clara. El tratamiento generalmente produce mielosupresión significativa, con infección o sangrado; Hay una latencia significativa antes de la recuperación de la médula. Durante este tiempo, la atención preventiva y de apoyo meticulosa es vital.

40 SECUENCIAS Y ANTICUERPOS DE POLIPÉPTIDO Y POLINUCLEÓTIDO

45 **[0050]** Se dan a conocer en el presente documento los polinucleótidos y polipéptidos que representan genes que se expresan diferencialmente en CMLMA humano. Estos polinucleótidos, polipéptidos y fragmentos de los mismos tienen usos que incluyen, pero no se limitan a, sondas y cebadores de diagnóstico como materiales de partida para sondas y cebadores, como inmunógenos para anticuerpos útiles en el diagnóstico y la terapia del cáncer, y similares como se discute en el presente documento.

50 **[0051]** Las composiciones de ácido nucleico incluyen fragmentos y cebadores, y son al menos aproximadamente 15 pb de longitud, al menos aproximadamente 30 pb de longitud, al menos aproximadamente 50 pb de longitud, al menos aproximadamente 100 pb, al menos aproximadamente 200 pb de longitud, al menos aproximadamente 300 pb de longitud, al menos aproximadamente 500 pb de longitud, al menos aproximadamente 800 pb de longitud, al menos aproximadamente 1 kb de longitud, al menos aproximadamente 2,0 kb de longitud, al menos aproximadamente 3,0 kb de longitud, a al menos aproximadamente 5 kb de longitud, al menos aproximadamente 10 kb de longitud, al menos aproximadamente 50 kb de longitud y usualmente tienen menos de aproximadamente 200 kb de longitud. En algunos casos, un fragmento de un polinucleótido es la secuencia codificante de un polinucleótido. También se incluyen variantes o variantes degeneradas de una secuencia proporcionada en este documento. En general, las variantes de un polinucleótido proporcionado aquí tienen un fragmento de identidad de secuencia que es mayor que al menos aproximadamente 65%, mayor que al menos aproximadamente 70%, mayor que al menos aproximadamente 75%, mayor que al menos aproximadamente 80%, mayor al menos aproximadamente 85%, o mayor que al menos aproximadamente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más (es decir, 100%) como en comparación con un fragmento de tamaño idéntico de una secuencia proporcionada. según lo determinado por el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman implementado en el programa MPSRCH (Oxford Molecular). Los ácidos nucleicos que tienen similitud de secuencia pueden detectarse mediante hibridación en condiciones de baja rigurosidad, p. ej., a 50°C y 1XSSC (solución salina 0,9 M/citrato de sodio 0,09 M) y permanecen unidos cuando se someten a lavado a 55°C en 1XSSC. La identidad de secuencia se puede determinar mediante hibridación en condiciones de alta rigurosidad, p. ej., a 50°C

o más y 0,1XSSC (solución salina 9 mM/citrato de sodio 0,9 mM). Los métodos y condiciones de hibridación son bien conocidos en la técnica, véase, p. ej., la patente de EE.UU. No. 5,707,829. Los ácidos nucleicos que son sustancialmente idénticos a las secuencias de polinucleótidos proporcionadas, p. ej., variantes alélicas, versiones genéticamente alteradas del gen, etc., se unen a las secuencias de polinucleótidos proporcionadas bajo condiciones de hibridación rigurosas.

**[0052]** Las sondas específicas para los polinucleótidos descritos en el presente documento se pueden generar utilizando las secuencias de polinucleótido descritas en este documento. Las sondas son generalmente un fragmento de una secuencia de polinucleótidos proporcionada en este documento. Las sondas pueden sintetizarse químicamente o pueden generarse a partir de polinucleótidos más largos usando enzimas de restricción. Las sondas pueden marcarse, p. ej., con una etiqueta radiactiva, biotinilada o fluorescente. Preferiblemente, las sondas se diseñan en base a una secuencia de identificación de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento.

**[0053]** Las composiciones de ácido nucleico descritas en este documento pueden usarse, p. ej., para producir polipéptidos, como sondas para la detección de ARNm en muestras biológicas (p. ej., extractos de células humanas) o ADNc producido a partir de dichas muestras, para generar copias adicionales de los polinucleótidos, para generar ribozimas u oligonucleótidos antisentido, y como sondas de ADN monocatenarias o como oligonucleótidos formadores de triple cadena.

**[0054]** Las sondas descritas en el presente documento se pueden usar para, p. ej., determinar la presencia o ausencia de uno cualquiera de los polinucleótidos proporcionados en este documento o variantes de los mismos en una muestra. Estos y otros usos se describen con más detalle a continuación. En un caso, el análisis por PCR en tiempo real se usa para analizar la expresión génica.

**[0055]** Los polipéptidos contemplados por la descripción incluyen los codificados por los polinucleótidos descritos y los genes a los que estos polinucleótidos se corresponden, así como ácidos nucleicos que, en virtud de la degeneración del código genético, no son idénticos en secuencia a los polinucleótidos divulgados. Otros polipéptidos contemplados incluyen polipéptidos que están codificados por polinucleótidos que se hibridan con el polinucleótido de la lista de secuencias. Por lo tanto, la descripción incluye un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento, o una variante de las mismas.

**[0056]** En general, el término "polipéptido" como se usa aquí se refiere al polipéptido de longitud completa codificado por el polinucleótido mencionados, el polipéptido codificado por el gen representado por el polinucleótido mencionados, así como porciones o fragmentos de los mismos. Los "polipéptidos" también incluyen variantes de las proteínas naturales, donde tales variantes son homólogas o sustancialmente similares a la proteína natural, y pueden ser de un origen de la misma especie o de especies diferentes que la proteína natural. En general, los polipéptidos variantes tienen una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80%, usualmente al menos aproximadamente 90%, y más usualmente al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con un polipéptido expresado diferencialmente descrito aquí. Los polipéptidos variantes pueden estar glicosilados de forma natural o no natural, es decir, el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en la proteína natural correspondiente.

**[0057]** Los fragmentos de los polipéptidos descritos en el presente documento, particularmente fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales, son de interés. Los fragmentos de interés típicamente tendrán al menos aproximadamente 10 aa a al menos aproximadamente 15 aa de longitud, generalmente al menos aproximadamente 50 aa de longitud, y pueden tener una longitud de hasta 300 aa o más, pero generalmente no excederán aproximadamente 1000 aa de longitud, donde el fragmento tendrá un tramo de aminoácidos que es idéntico a un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento, o un homólogo del mismo. Un fragmento de "al menos 20 aa de longitud", p. ej., pretende incluir 20 o más aminoácidos contiguos de, p. ej., el polipéptido codificado por un ADNc, en un clon de ADNc contenido en una biblioteca depositada o el soporte complementario del mismo. En este contexto, "aproximadamente" incluye el valor particularmente recitado o un valor mayor o menor por varios (5, 4, 3, 2 o 1) aminoácidos. Las variantes de proteínas descritas en el presente documento están codificadas por polinucleótidos que también se describen. El código genético puede usarse para seleccionar los codones apropiados para construir las variantes correspondientes. Los polinucleótidos pueden usarse para producir polipéptidos, y estos polipéptidos pueden usarse para producir anticuerpos mediante métodos conocidos descritos anteriormente y a continuación.

**[0058]** Un polipéptido puede ser recuperado y purificado a partir de cultivos de células recombinantes por métodos bien conocidos incluyendo sulfato de amonio o precipitación de etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Lo más preferiblemente, se emplea cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

**[0059]** Los polipéptidos también se pueden recuperar de: productos purificados de fuentes naturales, incluidos fluidos corporales, tejidos y células, ya sea directamente aislados o cultivados; productos de procedimientos químicos sintéticos; y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un huésped procariota o eucariota, que incluyen, p. ej., células bacterianas, planta de levadura superior, insectos y mamíferos.

**[0060]** Los productos génicos, incluyendo polipéptidos, ARNm (particularmente ARNm que tienen distintas estructuras secundarias y/o terciarias), ADNc, o gen completo, se pueden preparar y usar para generar anticuerpos para fines experimentales, de diagnóstico, y terapéuticos. Se pueden usar anticuerpos para identificar células o subtipos de CMLMA. El polinucleótido o ADNc relacionado se expresa como se describe en el presente documento, y se preparan anticuerpos. Estos anticuerpos son específicos de un epítipo en el polipéptido codificado por el polinucleótido y pueden precipitar o unirse a la proteína nativa correspondiente en una preparación celular o tisular o en un extracto libre de células de un sistema de expresión in vitro.

**[0061]** Los anticuerpos pueden ser utilizados para inmunofenotipificación de células y muestras biológicas. El producto de traducción de un gen expresado diferencialmente puede ser útil como marcador. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo específico, o una combinación de epítipos, permitirán la detección de poblaciones celulares que expresan el marcador. Se pueden utilizar varias técnicas usando anticuerpos monoclonales para detectar poblaciones celulares que expresan el marcador o marcadores, e incluyen separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos, "paneo" con anticuerpo unido a una matriz sólida (es decir, placa) y citometría de flujo (Véase, p. ej., la Pat. de EE.UU. N° 5,985,660; y Morrison et al. Cell, 96: 737-49 (1999)). Estas técnicas permiten la detección de poblaciones particulares de células; en inmunohistoquímica de muestras de biopsia; para detectar la presencia de marcadores vertidos por las células cancerosas en la sangre y otros fluidos biológicos, y similares.

**[0062]** En muchos casos, se miden los niveles de un gen sujeto o producto génico. Por medido se entiende estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel del producto genético en una primera muestra biológica, ya sea directamente (p. ej., determinando o estimando niveles absolutos del producto genético) o relativamente comparando los niveles con una segunda muestra biológica de control. En muchos casos, la segunda muestra biológica de control se obtiene de un individuo que no tiene cáncer. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce un nivel de control estándar de la expresión génica, puede usarse repetidamente como un estándar para la comparación. Otras muestras de control incluyen muestras de tejido canceroso.

**[0063]** Los métodos se pueden utilizar para detectar y/o medir niveles de ARNm de un gen que se expresa diferencialmente en una célula de cáncer. En algunos casos, los métodos comprenden: poner en contacto una muestra con un polinucleótido que corresponde a un gen expresado diferencialmente descrito en este documento en condiciones que permiten la hibridación; y detectar hibridación, si la hay. La detección de hibridación diferencial, cuando se compara con un control adecuado, es una indicación de la presencia en la muestra de un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. Los controles apropiados incluyen, p. ej., una muestra que se sabe que no contiene un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. Las condiciones que permiten la hibridación son conocidas en la técnica y se han descrito con más detalle anteriormente.

**[0064]** La detección también se puede lograr mediante cualquier método conocido, que incluye, pero no se limita a, hibridación in situ, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR (PCR de transcripción inversa), y matrices de transferencia de ARN o transferencia Northern o ARN., microarrays, etc., o combinaciones de tales técnicas, usando un polinucleótido marcado adecuadamente. Una variedad de marcadores y métodos de marcado para polinucleótidos son conocidos en la técnica y pueden usarse en los métodos de ensayo de la divulgación. La hibridación específica se puede determinar mediante comparación con los controles apropiados.

**[0065]** Las sondas de ácidos nucleicos marcados se pueden usar para detectar la expresión de un gen correspondiente al polinucleótido proporcionado, p. ej., en un formato macrochips, transferencia de Northern, etc. La cantidad de hibridación se puede cuantificar para determinar las cantidades relativas de expresión, p. ej., bajo una condición particular. Las sondas se utilizan para la hibridación in situ con células para detectar la expresión. Las sondas también pueden usarse in vivo para la detección diagnóstica de secuencias de hibridación. Las sondas pueden etiquetarse con un isótopo radiactivo. Se pueden usar otros tipos de marcadores detectables, como cromóforos, fluoróforos y enzimas.

**[0066]** Las matrices de polinucleótidos proporcionan una técnica de alto rendimiento que puede analizar una gran cantidad de polinucleótidos o polipéptidos en una muestra. Esta tecnología se puede utilizar como herramienta para probar la expresión diferencial. Una variedad de métodos para producir matrices, así como variaciones de estos métodos, se conocen en la técnica y se contemplan para su uso. Por ejemplo, se pueden crear matrices colocando sondas de polinucleótidos en un sustrato (p. ej., vidrio, nitrocelulosa, etc.) en una matriz o matriz bidimensional que tiene sondas unidas. Las sondas pueden unirse al sustrato por enlaces covalentes o por interacciones no específicas, como las interacciones hidrófobas.

#### CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

**[0067]** En leucemias mieloides agudas, la caracterización de células madre de cáncer permite el desarrollo de nuevos

tratamientos que se dirigen específicamente en contra de esta población crítica de las células, en particular su capacidad de auto-renovación, dando como resultado terapias más eficaces.

5 **[0068]** En las leucemias mieloides agudas humana se muestra en el presente documento que existe una subpoblación de células tumorales oncogénicas tanto con auto-renovación como con capacidad de diferenciación. Estas células tumorigénicas son responsables del mantenimiento del tumor y también dan lugar a un gran número de progenie de diferenciación anormal que no son tumorigénicas, cumpliendo así los criterios de las células madre cancerosas. El potencial tumorigénico está contenido dentro de una subpoblación de células cancerosas que expresan diferencialmente los marcadores de la presente descripción.

10 **[0069]** En algunos casos, el número de CMLMA en una muestra del paciente se determinó en relación con el número total de LMA las células cancerosas, donde un porcentaje mayor de CMLMA es indicativo del potencial para la continuación de la auto-renovación de las células con el fenotipo de cáncer. La cuantificación de CMLMA en una muestra de paciente puede compararse con una población de referencia, p. ej., una muestra de paciente como una muestra de sangre, una muestra de paciente en remisión, etc. En algunos casos, la cuantificación de CMLMA se realiza durante el curso del tratamiento, donde la cantidad de células cancerosas de LMA y el porcentaje de tales células que son CMLMA se cuantifican antes, durante y como seguimiento de un curso de terapia. Deseablemente, la terapia dirigida a las células madre cancerosas da como resultado una disminución en el número total y/o porcentaje de CMLMA en una muestra de paciente.

20 **[0070]** En otros casos, los agentes anti-cáncer están dirigidos a CMLMA mediante la unión a un marcador o combinación específica de los marcadores de la presente divulgación. En tales casos, los agentes anticancerígenos incluyen anticuerpos y derivados de unión a antígeno de los mismos específicos para un marcador o combinación de marcadores de la presente descripción, que se conjugan opcionalmente con un resto citotóxico. El agotamiento de CMLMA es útil en el tratamiento de LMA. El agotamiento logra una reducción en la CMLMA circulante en hasta aproximadamente un 30%, o hasta aproximadamente un 40%, o hasta aproximadamente un 50%, o hasta aproximadamente un 75% o más. El agotamiento se puede lograr usando un agente para agotar CMLMA *in vivo* o *ex vivo*.

25 **[0071]** El CMLMA se identifican por su fenotipo con respecto a marcadores particulares, y/o por su fenotipo funcional. En algunos casos, los CMLMA se identifican y/o aíslan mediante la unión a la célula con reactivos específicos para los marcadores de interés. Las células a analizar pueden ser células viables, o pueden ser células fijadas o incrustadas.

30 **[0072]** En algunos casos, la específica reactivos para los marcadores de interés son anticuerpos, que pueden estar directa o indirectamente marcado. Tales anticuerpos usualmente incluirán anticuerpos específicos para un marcador o combinación de marcadores de la presente descripción.

#### Tratamiento del cáncer

35 **[0073]** En el presente documento se describen métodos para reducir el crecimiento de células cancerosas. Los métodos proporcionan la disminución del número de células cancerosas que llevan un marcador específico o una combinación de marcadores, como se proporciona aquí, disminuyendo la expresión de un gen que se expresa de manera diferencial en una célula cancerosa, o disminuyendo el nivel y/o disminuyendo una actividad de un polipéptido asociado al cáncer. En general, los métodos comprenden poner en contacto una célula cancerosa con un agente de unión, p. ej., un anticuerpo o ligando específico para un marcador o combinación de marcadores proporcionados aquí.

40 **[0074]** "Reducir el crecimiento de células de cáncer" incluye, pero no se limita a, la reducción de la proliferación de células cancerosas, y reducir la incidencia de que una célula no cancerosa se convierta en una célula cancerosa. Se puede determinar fácilmente si se ha logrado una reducción en el crecimiento de células cancerosas usando cualquier ensayo conocido, que incluye, pero no se limita a, la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina; contando el número de célula durante un período de tiempo; detectar y/o medir un marcador asociado con LMA, etc.

45 **[0075]** En este documento se describen métodos para tratar el cáncer, que generalmente comprenden administrar a un individuo que lo necesita una sustancia que reduce el crecimiento de células cancerosas, en una cantidad suficiente para reducir el crecimiento de células cancerosas y tratar el cáncer. Se puede evaluar si una sustancia, o una cantidad específica de la sustancia, es efectiva en el tratamiento del cáncer usando cualquiera de una variedad de ensayos de diagnóstico conocidos para el cáncer, que incluyen, entre otros, biopsia, estudios radiográficos de contraste, tomografía computarizada y detección de un marcador tumoral asociado con cáncer en la sangre del individuo. La sustancia puede administrarse sistémicamente o localmente, generalmente sistémicamente.

50 **[0076]** Una sustancia, por ejemplo un fármaco quimioterapéutico que reduce el crecimiento de células de cáncer, puede dirigirse a una célula de cáncer. Por lo tanto, en algunos casos, se describe en el presente documento un método para administrar un fármaco a una célula cancerosa, que comprende administrar un complejo fármaco-anticuerpo a un sujeto, en donde el anticuerpo es específico para un polipéptido asociado al cáncer, y el fármaco es uno que reduce crecimiento de células cancerosas, una variedad de las cuales se conocen en la técnica. La focalización se puede lograr mediante el acoplamiento (p. ej., uniendo, directamente o mediante una molécula

enlazadora, ya sea covalente o no covalentemente, para formar un complejo fármaco-anticuerpo) un fármaco a un anticuerpo específico para un polipéptido asociado al cáncer. Los métodos para acoplar un fármaco a un anticuerpo son bien conocidos en la técnica y no necesitan elaborarse aquí.

5 Estadificación y diagnóstico

[0077] Leucemias mieloides agudas se realizaron mediante el análisis de la presencia de células madre de cáncer. La estadificación es útil para el pronóstico y el tratamiento. En un caso, una muestra de un paciente con leucemia mieloide aguda se tiñe con reactivos específicos para un marcador o combinación de marcadores de la presente descripción. El análisis de los patrones de tinción proporciona la distribución relativa de CMLMA, cuya distribución predice el estadio de la leucemia. En algunos casos, la muestra se analiza por histoquímica, que incluye inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y similares, en busca de la presencia de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> que expresan un marcador o combinación de marcadores de la presente descripción. La presencia de tales células indica la presencia de CMLMA.

[0078] En un caso, la muestra del paciente se compara con un control, o un valor de prueba estándar. En otro caso, la muestra del paciente se compara con una muestra previa a la leucemia, o con uno o más puntos temporales a lo largo del curso de la enfermedad.

[0079] Las muestras, incluyendo las secciones de tejido, diapositivas, *etc.* que contienen un tejido leucémico mieloide agudo, se tiñen con reactivos específicos para los marcadores que indican la presencia de células madre de cáncer. Las muestras pueden congelarse, incrustarse, presentarse en un microarray de tejidos y similares. Los reactivos, p. ej., anticuerpos, sondas de polinucleótidos, *etc.* pueden marcarse de forma detectable, o pueden marcarse indirectamente en el procedimiento de tinción. Los datos proporcionados en este documento demuestran que el número y la distribución de las células progenitoras es diagnóstico del estadio de la leucemia.

[0080] La información así derivado es útil en el pronóstico y diagnóstico, incluyendo la susceptibilidad a la aceleración de la enfermedad, el estado de un estado y la respuesta enferma a los cambios en el medio ambiente, tales como el paso del tiempo, el tratamiento con fármacos u otras modalidades. Las células también pueden clasificarse en función de su capacidad para responder a agentes y tratamientos terapéuticos, aislarse con fines de investigación, seleccionarse para la expresión génica y similares. Las muestras clínicas se pueden caracterizar además por análisis genéticos, proteómicos, tinción de la superficie celular u otros medios, para determinar la presencia de marcadores que son útiles en la clasificación. Por ejemplo, las anomalías genéticas pueden ser causa de susceptibilidad a la enfermedad o de respuesta al fármaco, o pueden estar vinculadas a tales fenotipos.

35 ANÁLISIS DE CÉLULAS DIFERENCIALES

[0081] La presencia de CMLMA en una muestra del paciente puede ser indicativa de la etapa de la leucemia. Además, la detección de CMLMA puede usarse para monitorear la respuesta a la terapia y para ayudar en el pronóstico. La presencia de CMLMA se puede determinar cuantificando las células que tienen el fenotipo de la célula madre. Además del fenotipo de la superficie celular, puede ser útil cuantificar las células en una muestra que tiene un carácter de "célula madre", que puede determinarse mediante criterios funcionales, como la capacidad de autorrenovarse, para dar lugar a tumores *in vivo*, p. ej., en un modelo de xenoinjerto, y similares.

[0082] Las muestras clínicas para uso en los métodos de la descripción se pueden obtener de una variedad de fuentes, particularmente sangre, aunque en algunas muestras de instancias como la médula ósea, pueden ser utilizados linfa, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, y similares. Dichas muestras se pueden separar por centrifugación, elutriación, separación por gradiente de densidad, aféresis, selección de afinidad, barrido, FACS, centrifugación con Hypaque, *etc.* antes del análisis, y generalmente se usará una fracción mononuclear (PBMC). Una vez que se obtiene una muestra, se puede usar directamente, congelar o mantener en un medio de cultivo apropiado por cortos períodos de tiempo. Se pueden emplear diversos medios para mantener las células. Las muestras pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento conveniente, como extracción de sangre, punción venosa, biopsia o similares. Usualmente, una muestra comprenderá al menos aproximadamente 10<sup>2</sup> células, más usualmente al menos aproximadamente 10<sup>3</sup> células, y preferiblemente 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> o más células. Típicamente, las muestras serán de pacientes humanos, aunque los modelos animales pueden encontrar uso, p. ej., equino, bovino, porcino, canino, felino, roedor, p. ej., ratones, ratas, hámster, primate, *etc.*

[0083] Una solución adecuada puede ser usado para dispersión o suspensión de la muestra celular. Dicha solución generalmente será una solución salina equilibrada, p. ej., solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, *etc.*, convenientemente complementada con suero fetal de ternera u otros factores naturales, junto con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5 a 25 mM. Los tampones convenientes incluyen HEPES, tampones de fosfato, tampones de lactato, *etc.*

[0084] El análisis de la tinción celular usará métodos convencionales. Las técnicas que proporcionan una enumeración precisa incluyen clasificadores de células activadas por fluorescencia, que pueden tener diversos grados de sofisticación, tales como múltiples canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, canales de impedancia, *etc.* Las células pueden seleccionarse contra células muertas empleando tintes asociados con

células muertas (p. ej. yoduro de propidio).

**[0085]** Los reactivos de afinidad pueden ser receptores específicos o ligandos para las moléculas de la superficie celular que han sido indicadas anteriormente. En adición a los reactivos de anticuerpo, antígeno de péptido-MHC y pares receptores de células T se pueden utilizar; ligandos peptídicos y receptores; moléculas efectoras y receptoras, y similares. Los anticuerpos y los receptores de células T pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser producidos por animales transgénicos, animales inmunizados, células B humanas o animales inmortalizadas, células transfectadas con vectores de ADN que codifican el anticuerpo o el receptor de células T, *etc.* Los detalles de la preparación de los anticuerpos y su idoneidad para su uso como miembros de unión específicos son bien conocidos por los expertos en la materia.

**[0086]** De particular interés es el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. Convenientemente, estos anticuerpos se conjugan con una etiqueta para su uso en separación. Las etiquetas incluyen perlas magnéticas, que permiten la separación directa, biotina, que se puede eliminar con avidina o estreptavidina unida a un soporte, fluorocromos, que se pueden usar con un clasificador de células activado por fluorescencia, o similares, para facilitar la separación del tipo de célula particular. Los fluorocromos que encuentran uso incluyen las ficobiliproteínas, p. ej., la ficoeritrina y las alofocianinas, la fluoresceína y el rojo de Texas. Con frecuencia, cada anticuerpo se marca con un fluorocromo diferente, para permitir la clasificación independiente de cada marcador.

**[0087]** Los anticuerpos se añaden a una suspensión de células, y se incuban durante un período de tiempo suficiente para unir los antígenos de superficie celular disponibles. La incubación usualmente durará al menos aproximadamente 5 minutos y usualmente menos de aproximadamente 30 minutos. Es deseable tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción, de modo que la eficacia de la separación no esté limitada por la falta de anticuerpos. La concentración apropiada se determina mediante valoración. El medio en donde se separan las células será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene de 0,1 a 0,5% de BSA. Varios medios están disponibles comercialmente y pueden usarse de acuerdo con la naturaleza de las células, incluyendo Medio Eagle modificado de Dulbecco (dMEM), solución de sal básica de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMI, medio Iscove, PBS con 5 mM EDTA, *etc.*, frecuentemente suplementado con suero de ternera fetal, BSA, HSA, *etc.*

**[0088]** Las células marcadas se cuantificaron luego en cuanto a la expresión de marcadores de superficie celular como se describió anteriormente.

**[0089]** La comparación de un análisis progenitor diferencial obtenida a partir de una muestra de paciente, y un análisis progenitor diferencial de referencia se logra mediante el uso de protocolos adecuados de deducción, sistemas de AI, comparaciones estadísticas, *etc.* Una comparación con un análisis de referencia diferencial progenitor de células normales, células de tejido similarmente enfermo, y similares, pueden proporcionar una indicación de la estadificación de la enfermedad. Se puede compilar una base de datos de análisis de referencia de progenitores diferenciales. Un análisis de particular interés rastrea a un paciente, p. ej., en las etapas crónicas y preleucémicas de la enfermedad, de tal manera que la aceleración de la enfermedad se observa en una etapa temprana. Los métodos de la divulgación proporcionan la detección de la aceleración antes del inicio de los síntomas clínicos y, por lo tanto, permiten una intervención terapéutica temprana, p. ej., el inicio de la quimioterapia, el aumento de la dosis de quimioterapia, la selección cambiante del fármaco quimioterapéutico y similares.

#### 45 Composiciones de CMLMA

**[0090]** El CMLMA puede separarse de una mezcla compleja de células mediante técnicas que enriquecen para células que expresan diferencialmente un marcador o combinación de marcadores de la presente descripción. Para aislar las células del tejido, se puede usar una solución apropiada para dispersión o suspensión. Dicha solución generalmente será una solución salina equilibrada, p. ej., solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, *etc.*, convenientemente complementada con suero fetal de ternera u otros factores naturales, junto con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5 a 5 25 mM. Tampones convenientes incluyen HEPES, tampones fosfato, tampones de lactato, *etc.*

**[0091]** Las células separadas pueden recogerse en cualquier medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, por lo general tiene un cojín de suero en la parte inferior del tubo de recogida. Varios medios están disponibles comercialmente y pueden usarse de acuerdo con la naturaleza de las células, incluyendo dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscove, *etc.*, frecuentemente suplementado con suero de ternera fetal.

**[0092]** Las composiciones altamente enriquecidas para CMLMA se consiguen de esta manera. La población de sujetos puede ser del 50% o más de la composición celular, y preferiblemente del 75% o más de la composición celular, y puede ser del 90% o más. Las células deseadas se identifican por su fenotipo superficial, por la capacidad de autorrenovarse, la capacidad de formar tumores, *etc.* La población celular enriquecida se puede usar inmediatamente, o se puede congelar a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenar durante largos períodos de tiempo, ser descongelada y capaz de ser reutilizada. Las células pueden almacenarse en 10% de DMSO, 90% de medio FCS. La población de células enriquecidas para CMLMA se puede usar en una variedad de ensayos de detección y cultivos,

como se describe a continuación.

**[0093]** La población CMLMA enriquecida puede ser cultivada *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido, p. ej., que contiene agar, metilcelulosa, *etc.* La población celular puede suspenderse convenientemente en un medio nutriente apropiado, tal como DMEM modificado de Iscove o RPMI-1640, normalmente suplementado con suero de ternera fetal (aproximadamente 5-10%), L-glutamina, un tiol, particularmente 2-mercaptoetanol, y antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomina.

**[0094]** El cultivo puede contener factores de crecimiento a los que las células son sensibles. Los factores de crecimiento, como se definen aquí, son moléculas capaces de promover la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación de las células, ya sea en cultivo o en el tejido intacto, a través de efectos específicos sobre un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen polipéptidos y factores no polipeptídicos. Se puede usar una amplia variedad de factores de crecimiento en el cultivo de las células, p. ej., LIF, factor de acero (ligando c-kit), EGF, insulina, IGF, ligando Flk-2, IL-11, IL-3, GM-CSF, eritropoyetina, trombopoyetina, *etc.*

**[0095]** Además de, o en lugar de factores de crecimiento, las células objeto se pueden cultivar en un cocultivo con fibroblastos, estroma u otras células de la capa alimentadora. Las células estromales adecuadas para su uso en el crecimiento de células hematopoyéticas son conocidas en la técnica. Éstas incluyen el estroma de médula ósea como se usa en "Whitlock-Witte" (Whitlock et al. [1985] Annu Rev Immunol 3: 213-235) o condiciones de cultivo "Dexter" (Dexter et al. [1977] J Exp Med 145: 1612-1616); y células estromales tímicas heterogéneas.

Ensayos de cribado

**[0096]** CMLMA que expresa un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación también son útiles para ensayos y cribado *in vitro* para detectar factores y agentes quimioterapéuticos que son activos en las células madre de cáncer. De particular interés son los ensayos de detección de agentes que son activos en células humanas. Se puede usar una amplia variedad de ensayos para este propósito, incluidos los inmunoensayos para la unión a proteínas; determinación del crecimiento celular, diferenciación y actividad funcional; producción de factores; y similares. En otros casos, los polipéptidos aislados que corresponden a un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación son útiles en ensayos de detección de fármacos.

**[0097]** En los ensayos de cribado para agentes biológicamente activos, fármacos anti-proliferativos, *etc.* el marcador o la composición CMLMA se pone en contacto con el agente de interés, y el efecto del agente evaluado mediante el control de los parámetros de salida en las células, tales como la expresión de los marcadores, viabilidad celular y similares; o eficacia o efecto de unión sobre la actividad enzimática o del receptor para polipéptidos. Las células pueden estar recién aisladas, cultivadas, genéticamente alteradas y similares. Las células pueden ser variantes ambientalmente inducidas de cultivos clonales: p. ej., dividirse en cultivos independientes y crecer en condiciones distintas, por ejemplo con o sin fármacos; en presencia o ausencia de citocinas o combinaciones de las mismas. La manera en que las células responden a un agente, particularmente un agente farmacológico, incluido el momento de las respuestas, es un reflejo importante del estado fisiológico de la célula.

**[0098]** Los parámetros son componentes cuantificables de células, particularmente componentes que pueden medirse con precisión, deseablemente en un sistema de alto rendimiento. Un parámetro puede ser cualquier componente celular o producto celular, incluido el determinante de la superficie celular, receptor, proteína o modificación conformacional o postraduccional del mismo, lípido, carbohidrato, molécula orgánica o inorgánica, ácido nucleico, p. ej., ARNm, ADN, *etc.* o una porción derivada de tal un componente celular o combinaciones del mismo. Si bien la mayoría de los parámetros proporcionarán una lectura cuantitativa, en algunos casos un resultado semicuantitativo o cualitativo será aceptable. Las lecturas pueden incluir un único valor determinado, o pueden incluir la media, el valor medio o la varianza, *etc.* Característicamente, se obtendrá un rango de valores de lectura de parámetros para cada parámetro a partir de una multiplicidad de los mismos ensayos. Se espera variabilidad y se obtendrá un rango de valores para cada conjunto de parámetros de prueba utilizando métodos estadísticos estándar con un método estadístico común utilizado para proporcionar valores únicos.

**[0099]** Los agentes de interés para la detección incluyen compuestos conocidos y desconocidos que abarcan numerosas clases químicas, principalmente moléculas orgánicas, que pueden incluir moléculas organometálicas, moléculas inorgánicas, secuencias genéticas, *etc.* Un aspecto importante de la divulgación es evaluar fármacos candidatos, que incluyen prueba de toxicidad; y similares.

**[0100]** Además de los agentes biológicos complejos, los agentes candidatos incluyen moléculas orgánicas que comprenden grupos funcionales necesarios para las interacciones estructurales, particularmente enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, frecuentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre las biomoléculas, incluidos péptidos, polinucleótidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

5 [0101] Se incluyen fármacos farmacológicamente activos, moléculas activas genéticamente, *etc.* Los compuestos de interés incluyen agentes quimioterapéuticos, hormonas o antagonistas de hormonas, *etc.* Ejemplos de agentes farmacéuticos adecuados para esta invención son los descritos en "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Goodman y Gilman, McGraw-Hill, Nueva York, Nueva York, (1996), Novena edición, en las secciones: Water, Salts and Ions; Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism; Drugs Affecting Gastrointestinal Function; Chemotherapy of Microbial Diseases; Chemotherapy of Neoplastic Diseases; Drugs Acting on Blood-Forming organs; Hormones and Hormone Antagonists; Vitamins, Dermatology; and Toxicology. También se incluyen toxinas y agentes de guerra biológica y química, p. ej., ver Somani, SM (Ed.), "Chemical Warfare Agents", Academic Press, Nueva York, 1992).

10 [0102] Los compuestos de prueba incluyen todas las clases de moléculas descritas anteriormente, y pueden comprender además muestras de contenido desconocido. De interés son las mezclas complejas de compuestos naturales derivados de fuentes naturales como las plantas. Si bien muchas muestras comprenderán compuestos en solución, también se pueden analizar muestras sólidas que se pueden disolver en un disolvente adecuado. Las muestras de interés incluyen muestras ambientales, p. ej., agua subterránea, agua de mar, desechos mineros, *etc.*; muestras biológicas, p. ej., lisados preparados a partir de cultivos, muestras de tejidos, *etc.*; fabricación de muestras, p. ej., tiempo transcurrido durante la preparación de productos farmacéuticos; así como bibliotecas de compuestos preparados para análisis; y similares. Las muestras de interés incluyen compuestos que se evalúan por su valor terapéutico potencial, es decir, candidatos a fármacos.

15 [0103] El término "muestras" también incluye los fluidos descritos anteriormente a los que se han agregado componentes adicionales, p. ej., componentes que afectan la fuerza iónica, el pH, la concentración total de proteínas, *etc.* Además, las muestras pueden tratarse para lograr fraccionamiento o concentración mínima parcial. Las muestras biológicas pueden almacenarse si se tiene cuidado para reducir la degradación del compuesto, p. ej., bajo nitrógeno, congelado o una combinación de los mismos. El volumen de muestra utilizado es suficiente para permitir una detección medible, generalmente es suficiente de aproximadamente 0,1 a 1 ml de una muestra biológica.

20 [0104] Los compuestos, incluyendo los agentes candidatos, se obtienen de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, existen numerosos medios disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluidas las biomoléculas, incluida la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Además, las bibliotecas y compuestos producidos de forma natural o sintética se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas directas o aleatorias, como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, *etc.* para producir análogos estructurales.

25 [0105] Los agentes se seleccionan para determinar la actividad biológica añadiendo el agente a al menos una y habitualmente una pluralidad de muestras de células, generalmente junto con células que carecen del agente. El cambio en los parámetros en respuesta al agente se mide, y el resultado evaluado por comparación con cultivos de referencia, p. ej., en la presencia y ausencia del agente, obtenidos con otros agentes, *etc.*

30 [0106] Los agentes se añaden convenientemente en solución, o forma fácilmente soluble, al medio de células en cultivo. Los agentes pueden agregarse en un sistema de flujo continuo, como una corriente, intermitente o continua, o alternativamente, agregando un bolo del compuesto, individual o incrementalmente, a una solución estática. En un sistema de flujo continuo, se usan dos fluidos, donde uno es una solución fisiológicamente neutra y el otro es la misma solución con el compuesto de prueba agregado. El primer líquido se pasa sobre las células, seguido por el segundo. En un método de solución única, se agrega un bolo del compuesto de prueba al volumen de medio que rodea las células. Las concentraciones generales de los componentes del medio de cultivo no deberían cambiar significativamente con la adición del bolo, o entre las dos soluciones en un método de flujo continuo.

35 [0107] Las formulaciones de agente preferidas no incluyen componentes adicionales, tales como conservantes, que pueden tener un efecto significativo sobre la formulación global. Por lo tanto las formulaciones preferidas consisten esencialmente en un compuesto biológicamente activo y un vehículo fisiológicamente aceptable, por ejemplo agua, etanol, DMSO, *etc.* Sin embargo, si un compuesto es líquido sin un disolvente, la formulación puede consistir esencialmente en el propio compuesto.

40 [0108] Se puede ejecutar una pluralidad de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Como se conoce en la técnica, la determinación de la concentración efectiva de un agente generalmente usa un rango de concentraciones resultante de diluciones 1:10 u otra escala logarítmica. Las concentraciones se pueden refinar aún más con una segunda serie de diluciones, si es necesario. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección del agente o en o por debajo de la concentración de agente que no produce un cambio detectable en el fenotipo.

45 [0109] Varios métodos se pueden utilizar para cuantificar la presencia de los marcadores seleccionados. Para medir

la cantidad de una molécula que está presente, un método conveniente es marcar una molécula con un resto detectable, que puede ser fluorescente, luminiscente, radioactivo, enzimáticamente activo, *etc.*, particularmente una molécula específica para unirse al parámetro con alta afinidad. Los restos fluorescentes están fácilmente disponibles para etiquetar prácticamente cualquier biomolécula, estructura o tipo de célula. Los restos inmunofluorescentes se pueden dirigir para que se unan no solo a proteínas específicas sino también a conformaciones específicas, productos de escisión o modificaciones del sitio como la fosforilación. Los péptidos y proteínas individuales se pueden diseñar para autofluorescencia, p. ej., expresándolos como quimeras de proteínas fluorescentes verdes dentro de las células (para una revisión, ver Jones et al. (1999) Trends Biotechnol. 17(12):477-81). Por lo tanto, los anticuerpos pueden modificarse genéticamente para proporcionar un tinte fluorescente como parte de su estructura. Dependiendo de la etiqueta elegida, los parámetros pueden medirse usando otras etiquetas que no sean fluorescentes, usando técnicas de inmunoensayo tales como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunosorbancia ligada a enzimas (ELISA), inmunoensayos enzimáticos homogéneos y técnicas no enzimáticas relacionadas. La cuantificación de los ácidos nucleicos, especialmente los ARN mensajeros, también es de interés como parámetro. Estos pueden medirse mediante técnicas de hibridación que dependen de la secuencia de nucleótidos de ácido nucleico. Las técnicas incluyen métodos de reacción en cadena de la polimerasa, así como técnicas de matriz genética. Ver Protocolos actuales en biología molecular, Ausubel et al., Eds, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 2000; Freeman y col. (1999) Biotechniques 26 (1): 112-225; Kawamoto y col. (1999) Genome Res 9 (12): 1305-12; y Chen et al. (1998) Genomics 51 (3): 313-24, para ejemplos.

## 20 Agotamiento de CMLMA

**[0110]** El agotamiento de CMLMA es útil en el tratamiento de LMA. El agotamiento se puede lograr por varios métodos. El agotamiento se define como una reducción en la población diana en hasta aproximadamente un 30%, o hasta aproximadamente un 40%, o hasta aproximadamente un 50%, o hasta aproximadamente un 75% o más. Un agotamiento efectivo generalmente está determinado por la sensibilidad de la enfermedad en particular a los niveles de la población diana. Por lo tanto, en el tratamiento de ciertas afecciones, un agotamiento de incluso aproximadamente el 20% podría ser beneficioso.

**[0111]** Un agente específico de marcador que agota específicamente el CMLMA diana se usa para contactar la sangre del paciente *in vitro* o *in vivo*, en donde después de la etapa de contacto, hay una reducción en el número de CMLMA viable en la población diana. Un agente ejemplar para tales propósitos es un anticuerpo que se une específicamente a un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación en la superficie del CMLMA diana. Una dosis efectiva de anticuerpos para tal propósito es suficiente para disminuir la población diana al nivel deseado, p. ej., como se describió anteriormente. Los anticuerpos para tales fines pueden tener baja antigenicidad en humanos o pueden ser anticuerpos humanizados.

**[0112]** En un caso, los anticuerpos para reducir la población diana se añaden a la sangre del paciente *in vivo*. En otro caso, los anticuerpos se agregan a la sangre del paciente *ex vivo*. Las perlas recubiertas con el anticuerpo de interés se pueden agregar a la sangre, las células diana unidas a estas perlas se pueden eliminar de la sangre usando procedimientos comunes en la técnica. En un caso, las perlas son magnéticas y se eliminan con un imán. Alternativamente, cuando el anticuerpo está biotinilado, también es posible inmovilizar indirectamente el anticuerpo en una fase sólida que ha adsorbido avidina, estreptavidina o similares. La fase sólida, generalmente perlas de agarosa o sefarosa, se separan de la sangre mediante una breve centrifugación. Múltiples métodos para marcar anticuerpos y eliminar tales anticuerpos y cualquier célula unida a los anticuerpos son rutinarios en la técnica. Una vez que se ha alcanzado el grado deseado de agotamiento, la sangre se devuelve al paciente. El agotamiento de las células diana *ex vivo* disminuye los efectos secundarios, como las reacciones a la infusión asociadas con la administración intravenosa. Una ventaja adicional es que el repertorio de anticuerpos disponibles se expande significativamente ya que este procedimiento no tiene que limitarse a anticuerpos con baja antigenicidad en humanos o anticuerpos humanizados.

**[0113]** En algunas realizaciones, los anticuerpos para el agotamiento son anticuerpos biespecíficos. "Anticuerpo biespecífico" y "anticuerpos biespecíficos", también conocidos como anticuerpos bifuncionales, se refiere a anticuerpos que reconocen dos antígenos diferentes en virtud de poseer al menos un primer sitio de combinación de antígenos específico para un primer antígeno o hapteno, y al menos un segundo sitio de combinación de antígenos específico para un segundo antígeno o hapteno. Dichos anticuerpos se pueden producir por métodos de ADN recombinante o incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos producidos químicamente por métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos biespecíficos incluyen todos los anticuerpos o conjugados de anticuerpos, o formas poliméricas de anticuerpos que son capaces de reconocer dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos que se han reducido y reformado para retener sus características bivalentes y a los anticuerpos que se han acoplado químicamente para que puedan tener varios sitios de reconocimiento de antígeno para cada antígeno.

**[0114]** Los anticuerpos biespecíficos para uso en los métodos de la presente divulgación se unen a al menos uno de los antígenos CMLMA descritos en este documento, y pueden unirse a dos o más antígenos CMLMA descritos en este documento. Las combinaciones de antígeno de interés incluyen, sin limitación, CD47 + CD96, CD47 + CD99, CD47 + Tim3, CD47 + CD97. En algunas realizaciones, una especificidad del anticuerpo tiene una baja afinidad, p. ej., menos

de aproximadamente  $10^{-9}$  constante de unión, usualmente menos de aproximadamente  $10^{-8}$  constante de unión, y puede ser más de aproximadamente  $10^{-7}$  constante de unión.

5 **[0115]** Los anticuerpos adecuados para la práctica de los métodos de la descripción son preferiblemente monoclonales y multivalentes, y pueden ser anticuerpos quiméricos humanos, humanizados o, que comprenden anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, y/o fragmentos de unión de cualquiera de los anteriores. En ciertos casos, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno humano de la presente descripción e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena, Fvs unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub>. Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, incluidos los anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: dominios de región bisagra, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> y CL. También se incluyen en la divulgación fragmentos de unión a antígeno que comprenden cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región bisagra, dominios CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> y CL. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, murinos (p. ej., ratones y ratas), burros, ovejas, conejos, golosinas, cobayas, camélidos, caballos o pollos. Como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana, de células B humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas.

20 **[0116]** Los anticuerpos adecuados para la práctica de los métodos de la presente divulgación pueden ser biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Además, los anticuerpos de la presente descripción pueden tener un bajo riesgo de toxicidad contra granulocitos (neutrófilos), células NK y células CD4+ como células espectadoras.

25 **[0117]** Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas pesadas de cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante pasos de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Trauneker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

35 **[0118]** Según otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. Tales interfaces pueden comprender al menos una parte del dominio CH<sub>3</sub> de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (p. ej., tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (p. ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, como los homodímeros. Un método alternativo vincula dos regiones variables de cadena sencilla diferentes al antígeno termoestable (HSA). El uso de HSA como enlazador aumenta la vida media en suero y tiene el beneficio de una baja inmunogenicidad.

45 **[0119]** Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a la avidina, el otro a la biotina. Dichos anticuerpos, p. ej., se han propuesto para dirigir las células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de EE.UU. N° 4,676,980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la patente de EE.UU. N° 4,676,980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

55 **[0120]** Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se cortan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados luego se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Luego, uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tiol por reducción con mercaptoet-hilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

65 **[0121]** También se han descrito diversas técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kos-telny y col., J. Immunol, 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera

de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se ven obligados a emparejarse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado sobre otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de cadena sencilla Fv (sFv). Ver Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se ha descrito en Zapata et al. Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ( $V_H$ - $C_{H1}$ - $V_H$ - $C_{H1}$ ) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

**[0122]** En el contexto de la presente invención, se entiende que los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab y  $F(ab')_2$ ), anticuerpos quiméricos anticuerpos bifuncionales o biespecíficos y los complejos de anticuerpos tetraméricos. Se entiende que los anticuerpos son reactivos contra un antígeno seleccionado en la superficie de una célula T si se unen con una afinidad apropiada (constante de asociación), p. ej., mayor o igual que  $10^7 M^{-1}$ . Además, los anticuerpos que pueden usarse en los métodos de la presente descripción también pueden describirse o especificarse en términos de sus afinidades de unión incluyen aquellos con una constante de disociación o  $K_d$  inferior a  $5 \times 10^{-2} M$ ,  $10^{-2} M$ ,  $5 \times 10^{-3} M$ ,  $10^{-3} M$ ,  $5 \times 10^{-4} M$ ,  $10^{-4} M$ ,  $5 \times 10^{-5} M$ ,  $10^{-5} M$ ,  $5 \times 10^{-6} M$ ,  $10^{-6} M$ ,  $5 \times 10^{-7} M$ ,  $10^{-7} M$ ,  $5 \times 10^{-8} M$ ,  $10^{-8} M$ ,  $5 \times 10^{-9} M$ ,  $10^{-9} M$ ,  $5 \times 10^{-10} M$ ,  $10^{-9} M$ ,  $5 \times 10^{-11} M$ ,  $10^{-11} M$ ,  $5 \times 10^{-12} M$ ,  $10^{-12} M$ ,  $5 \times 10^{-13} M$ ,  $10^{-13} M$ ,  $5 \times 10^{-14} M$ ,  $10^{-14} M$ ,  $5 \times 10^{-15} M$ ,  $10^{-15} M$ .

**[0123]** Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos seleccionados para utilidad de la misma manera que la descrita anteriormente para los anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos  $F(ab')_2$  pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento  $F(ab')_2$  resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'.

**[0124]** La invención también contempla derivados de anticuerpos quiméricos, es decir, moléculas de anticuerpos que combinan una región variable animal no humana y una región constante humana. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, p. ej., el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se han descrito una variedad de enfoques para fabricar anticuerpos quiméricos y se pueden usar para fabricar anticuerpos quiméricos que contienen la región variable de inmunoglobulina que reconoce los antígenos seleccionados en la superficie de células diferenciadas o células tumorales. Véanse, p. ej., Morrison et al., 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81,6851; Takeda y col., 1985, Nature 314: 452; Cabilly et al., Patente de EE.UU. N° 4,816,567; Boss et al., Patente de EE.UU. N° 4,816,397; Tanaguchi et al., Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, patente del Reino Unido GB 2177096B.

**[0125]** La conjugación química se basa en el uso de reactivos homo- y heterobifuncionales con grupos E-amino o grupos de tiol de la región bisagra. Los reactivos homobifuncionales como el 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DNTB) generan enlaces disulfuro entre los dos Fabs, y 0-fenilendimaleimida (O-PDM) generan enlaces tioéter entre los dos Fabs (Brenner et al., 1985, Glennie et al., 1987). Los reactivos heterobifuncionales como el N-succinimidilo-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) combinan grupos amino expuestos de anticuerpos y fragmentos Fab, independientemente de la clase o el isotipo (Van Dijk et al., 1989).

**[0126]** Los anticuerpos de la descripción, es decir, los anticuerpos que son útiles para el tratamiento de cánceres, así como otro tipo de cáncer que comprende células madre de cáncer que expresan antígenos expuestos en la Tabla 1, incluyen derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de tal manera que la unión covalente no impide que el anticuerpo se una a los antígenos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, p. ej., por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a la escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

**[0127]** Los kits pueden proporcionarse, en donde el kit comprenderá reactivos de tinción que son suficientes para identificar diferencialmente la CMLMA descrita en este documento. Una combinación de interés puede incluir uno o más reactivos específicos para un marcador o combinación de marcadores de la presente descripción, y puede incluir además anticuerpos específicos para CD96, CD34 y CD38. Los reactivos de tinción son preferiblemente anticuerpos, y pueden marcarse de forma detectable. Los kits también pueden incluir tubos, tampones, etc., e instrucciones de uso.

**[0128]** Se ha de entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, animales de especies o géneros, y reactivos descritos, como tales pueden variar. También debe entenderse que la

terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

[0129] Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, p. ej., la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el cultivo" incluye referencia a uno o más cultivos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia al que pertenece esta invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

EXPERIMENTAL

Ejemplo 1

Identificación de las moléculas de la superficie celular expresadas preferentemente en células madre de leucemia mieloide aguda humana en comparación con sus homólogos normales

[0130] *Identificación prospectiva de un progenitor multipotente humano, la célula de origen para CML de LMA.* La identificación de las moléculas de la superficie celular que se expresan preferentemente en CML de LMA se facilitaría enormemente determinando la célula dentro de la jerarquía hematopoyética normal que se transforma para convertirse en un CML de LMA. La opinión predominante en el campo ha sido que el CML de LMA surge de las células madre hematopoyéticas (HSC), ya que ambas poblaciones de células madre están enriquecidas en células Lin-CD34+CD38-. Sin embargo, se ha demostrado que los HSC humanos expresan CD90, mientras que los CML de LMA son CD90-. Además, se encontró que el HSC de pacientes con LMA de remisión a largo plazo t(8;21) contenía el producto de translocación AML1-ETO, lo que sugiere que el HSC era preleucémico y que la transformación completa a CML de LMA se produjo en un progenitor corriente abajo.

[0131] Si bien es ciertamente posible que HSC sea de hecho la célula de origen de CML de LMA, y que estas células pierdan la expresión de CD90 como consecuencia de la transformación, también es posible que CML de LMA tiene su origen a partir de células Lin-CD34+CD38-CD90- corriente abajo. Utilizamos un modelo de xenotrasplante de recién nacido NOD/SCID/ILO-2R gamma nulo (NOG) para analizar la función de las subpoblaciones de sangre de cordón Lin-CD34+CD38-, identificadas en base a la expresión de CD90 y CD45RA. Las células Lin-CD34+CD38-CD90+ produjeron un injerto de linaje múltiple a largo plazo y formaron trasplantes secundarios exitosos, y por lo tanto contenían HSC. El trasplante de células Lin-CD34+CD38-CD90-CD45RA- purificadas dio como resultado niveles más bajos de injerto de linaje múltiple en receptores primarios y una capacidad reducida estadísticamente significativa para formar trasplantes secundarios a largo plazo. De hecho, con el trasplante de 50 células purificadas, estas células no pudieron injertarse a largo plazo, a diferencia del HSC Lin-CD34+CD38-CD90+. Por lo tanto, las células Lin-CD34+CD38-CD90-CD45RA- son multipotentes y poseen una capacidad de autorrenovación limitada. Estas células se denominan progenitores multipotentes (MPP) y representan la posible célula de origen de CML de LMA.

[0132] *Uso de perfiles de expresión génica para identificar moléculas de superficie celular expresadas preferentemente en CML de LMA en comparación con sus homólogos normales, HSC y MPP.* Las moléculas de la superficie celular expresadas preferentemente en células madre de leucemia mieloide aguda humana (CML DE LMA) en comparación con sus contrapartes normales tienen aplicaciones terapéuticas descritas a continuación. Una estrategia para identificar tales moléculas ha sido generar perfiles de expresión génica de CML de LMA y HSC y MPP normales, y compararlos para genes expresados diferencialmente.

[0133] HSC y MPP de médula ósea normal (n=4) y CML de LMA (n=9) se purificaron mediante FACS. El ARN total se preparó, amplificó e hibridó con microarrays de ADN humano Affymetrix. El análisis estadístico identificó 4037 genes expresados diferencialmente entre HSC y CML, y 4208 genes expresados diferencialmente entre MPP y CML, con p<0,05 y una tasa de descubrimiento falso del 5% (Figura 1A). La investigación de estos genes expresados diferencialmente identificó 288 y 318 moléculas de la superficie celular expresadas preferentemente en CML de LMA por al menos 2 veces en comparación con HSC y MPP, respectivamente. Se indican los miembros seleccionados de esta lista, incluidos muchos con la mayor expresión preferencial en CML de LMA (Figura 1B, Tabla 1).

Tabla 1

| Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción                             |
|----------------|-----------|------------------|---|
| 94,34          | M27331    | TRGC2            | Receptor de células T gamma constante 2 |
| 57,47          | NM_005816 | CD96             | Antígeno CD96                           |
| 47,17          | AI862120  | MAMDC2           | Dominio MAM que contiene 2              |
| 32,36          | AF348078  | SUCNR1           | receptor 1 de succinato                 |
| 32,05          | M16768    | TRGC2            | Receptor de células T gamma constante 2 |

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción  |
|----|----------------|-----------|------------------|--|
| 5  | 30,96          | NM_002182 | IL1RAP           | proteína accesoria del receptor de interleucina 1  |
|    | 29,85          | M13231    | TRGC2            | Receptor de células T gamma constante 2  |
|    | 27,55          | NM_003332 | TYROBP           | Proteína de unión a la proteína tirosina quinasa TYRO  |
|    | 26,88          | NM_004271 | LY86             | antígeno linfocitario 86   |
| 10 | 20,96          | NM_014879 | P2RY14           | receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 14  |
|    | 18,38          | BC020749  | CD96             | Antígeno CD96  |
|    | 18,38          | NM_005048 | PTHR2            | receptor 2 de la hormona paratiroidea  |
|    | 17,73          | A1625747  | ADRB1            | Adrenérgico, beta-1-, receptor   |
| 15 | 17,36          | NM_015376 | RASGRP3          | Proteína liberadora de guanilo RAS 3 (regulada por calcio y DAG)                                 |
|    | 16,84          | U62027    | C3AR1            | componente complementario 3a receptor 1  |
|    | 14,49          | AW025572  | HAVCR2           | virus de la hepatitis A receptor celular 2   |
|    | 12,48          | AF285447  | HCST             | transductor de señal de células hematopoyéticas  |
| 20 | 11,92          | A1805323  | LGR7             | Receptor 7 acoplado a proteínas G que contiene repeticiones rico en leucina                      |
|    | 11,67          | NM_001197 | BIK              | Asesino que interactúa con BCL2 (inductor de apoptosis)  |
|    | 11,53          | NM_018092 | NETO2            | neuropilina (NRP) y tolloide (TLL) 2   |
|    | 11,07          | N74607    | AQP3             | aquaporin 3  |
| 25 | 10,88          | BF439675  | CD69             | Antígeno CD69 (p60, antígeno de activación temprana de células T)                                |
|    | 10,48          | NM_001769 | CD9              | Antígeno CD9 (p24)   |
|    | 10,32          | AF167343  | IL1RAP           | proteína accesoria del receptor de interleucina 1  |
|    | 9,52           | AA814140  | C5orf18          | marco de lectura abierto 18 del cromosoma 5  |
| 30 | 8,77           | NM_005582 | CD180            | Antígeno CD180   |
|    | 7,46           | AF039686  | GPR34            | Receptor 34 acoplado a proteínas G   |
|    | 7,30           | A1056776  | ITGA6            | Integrina, alfa 6  |
|    | 7,19           | AJ277151  | TNFRSF4          | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 4                             |
| 35 | 6,99           | A1738675  | SELPLG           | Selectina P ligando  |
|    | 6,85           | AA888858  | PDE3B            | Fosfodiesterasa 3B, inhibida por cGMP  |
|    | 6,80           | AU149572  | ADCY2            | adenilato ciclase 2 (cerebro)  |
|    | 6,80           | NM_002299 | LCT              | lactasa  |
| 40 | 6,58           | NM_005296 | GPR23            | Receptor 23 acoplado a proteínas G   |
|    | 6,45           | NM_004106 | FCER1G           | Fc fragmento de IgE, receptor de alta afinidad   |
|    | 6,29           | A1741056  | SELPLG           | selectina P ligando  |
|    | 6,25           | AW406569  | MGC15619         |  |
|    | 6,06           | M81695    | ITGAX            | integrina alfa X   |
| 45 | 5,92           | NM_003494 | DYSF             | disferlina   |
|    | 5,85           | A1860212  | PAG1             | fósoproteína asociada a microdominios de glucosfingolípidos 1                                    |
|    | 5,75           | NM_013447 | EMR2             | módulo tipo egf que contiene, tipo mucina, tipo receptor de hormona 2                            |
| 50 | 5,62           | NM_017806 | LIMA1            | Adaptador transmembrana interactivo Lck 1  |
|    | 5,62           | AK092824  | AMN              | Homólogo sin amnios (ratón)  |
|    | 5,59           | AF345567  | GPR174           | Receptor 174 acoplado a proteínas G  |
|    | 5,29           | BC041928  | IL1 RAP          | Proteína accesoria del receptor de interleucina 1  |
| 55 | 5,26           | L03419    | FCGR1A           | Fc fragmento de IgG, receptor de alta afinidad la (CD64); Fc-receptor gamma I B2                 |
|    | 5,24           | BG230586  | SLC7A6           | familia portadora de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y +), miembro 6 |
|    | 5,18           | AF015524  | CCRL2            | quimiocina (motivo CC) tipo receptor 2   |
| 60 | 5,13           | AA631143  | SLC45A3          | familia portadora de solutos 45, miembro 3   |
|    | 5,10           | AJ240085  | TRAT1            | Adaptador transmembrana asociado a receptor de células T 1                                       |
|    | 5,05           | AW183080  | GPR92            | Receptor 92 acoplado a proteínas G   |
|    | 5,03           | NM_002120 | HLA-DOB          | complejo principal de histocompatibilidad, clase II, OD beta                                     |
|    | 5,03           | NM_015364 | LY96             | linfocito antigen 96   |
| 65 | 4,90           | NM_020399 | GOPC             | PDZ asociado a Golgi y motivo de bobina en espiral que contiene                                  |

ES 2 796 085 T3

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción   |
|----|----------------|-----------|------------------|---|
| 5  | 4,88           | AK026133  | SEMA4B           | semaforina  |
|    | 4,88           | BC041664  | VMD2             | distrofia macular viteliforme 2   |
|    | 4,85           | NM_152592 | C14orf49         | marco de lectura abierto 49 del cromosoma 14  |
|    | 4,85           | AA923524  | RASGRP4          | Proteína liberadora de guanilo RAS 4  |
| 10 | 4,85           | BC008777  | ITGAL            | integrina, alfa L)  |
|    | 4,67           | AF014403  | PPAP2A           | ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2A   |
|    | 4,65           | AK097698  | SORCS2           | Dominio VPS10 relacionado con Sortilin que contiene el receptor 2                                     |
|    | 4,63           | X14355    | FCGR1A           | Fc fragmento de IgG, alta afinidad la, receptor (CD64)  |
| 15 | 4,55           | NM_001629 | ALOX5AP          | proteína activadora de 5-lipoxigenasa de araquidonato   |
|    | 4,50           | AU155968  | C18orf1          | marco de lectura abierto 1 del cromosoma 18   |
|    | 4,44           | AK075092  | HERV-FRD         | Proteína HERV-FRD ancestral Env poliproteína  |
|    | 4,42           | NM_020960 | GPR107           | Receptor 107 acoplado a proteínas G   |
| 20 | 4,37           | BC000039  | FAM26B           | familia con similitud de secuencia 26, miembro B  |
|    | 4,35           | NM_153701 | IL12RB1          | receptor de interleucina 12, beta 1   |
|    | 4,35           | AI762344  | PTGER1           | receptor 1 de prostaglandina E EP1), 42 kDa   |
|    | 4,31           | NM_006459 | SPFH1            | Familia de dominio SPFH, miembro 1  |
|    | 4,27           | NM_003126 | SPTA1            | espectrina, alfa, eritrocítico 1 (eliptocitosis 2)  |
| 25 | 4,22           | AL518391  | AQP1             | aquaporina 1 (proteína formadora de canales, 28 kDa)  |
|    | 4,12           | AK026188  | PCDHGC3          | subfamilia C de protocadherina gamma  |
|    | 4,10           | AU146685  | EDG2             | Diferenciación endotelial, receptor acoplado a la proteína G del ácido lisofosfatídico, 2             |
| 30 | 4,05           | BE673587  | SLC14A1          | Familia portadora de solutos 14 (transportador de urea), miembro 1 (grupo sanguíneo Kidd)             |
|    | 4,02           | BF129969  | TSPAN2           | tetraspanina 2  |
|    | 4,00           | AW243272  | KCNK5            | Canal de potasio, subfamilia K, miembro 5   |
|    | 3,98           | T68858    | DHRS3            | Miembro 3 de deshidrogenasa/reductasa (familia SDR)   |
| 35 | 3,94           | AI827849  | VTI1A            | Transporte de vesículas a través de la interacción con t-SNARE homólogo 1A (levadura)                 |
|    | 3,86           | AL134012  | NRXN2            | Neurexina 2   |
|    | 3,83           | BG230614  | CD47             | Antígeno CD47   |
|    | 3,80           | AI869717  | MGC15523         | MGC15523  |
| 40 | 3,80           | AI458583  | SIMP             | Fuente de péptidos inmunodominantes asociados a MHC   |
|    | 3,79           | NM_002183 | IL3RA            | receptor de interleucina 3, alfa (baja afinidad)  |
|    | 3,79           | AA608820  | NRXN2            | neurexina 2   |
|    | 3,73           | NM_000206 | IL2RG            | receptor de interleucina 2  |
|    | 3,72           | BC002737  | VAMP2            | synaptobrevin 2   |
| 45 | 3,72           | BC005884  | BID              | Agonista de la muerte del dominio que interactúa BH3; BH3 interactuando dominio agonista de la muerte |
|    | 3,68           | AI688418  | PLXNA2           | plexina A2  |
|    | 3,68           | BC003105  | PTP4A3           | proteína tirosina fosfatasa tipo IVA, miembro 3   |
|    | 3,68           | NM_001772 | CD33             | Antígeno CD33 (gp67)  |
| 50 | 3,65           | BC007524  | SPAG9            | esperma asociado antígeno 9   |
|    | 3,64           | AI344200  | SLC25A35         | portador de solutos familia 25, miembro 35  |
|    | 3,64           | BC005253  | KLHL20           | kelch-like 20 (Drosophila)  |
|    | 3,60           | AI335263  | NETO2            | neuropilina (NRP) y tolloide (TLL) 2  |
| 55 | 3,58           | BF381837  | C20orf52         | marco de lectura abierto 52 del cromosoma 20  |
|    | 3,51           | NM_002886 | RAP2A            | RAP2A   |
|    | 3,50           | NM_007063 | TBC1D8           | Familia de dominio TBC1, miembro 8 (con dominio GRAM)   |
|    | 3,45           | AK027160  | BCL2L11          | BCL2-like 11 (facilitador de apoptosis)   |
| 60 | 3,44           | BF055366  | EDG2             | diferenciación endotelial, receptor acoplado a la proteína G del ácido lisofosfatídico, 2             |
|    | 3,42           | NM_003608 | GPR65            | Receptor 65 acoplado a proteínas G  |
|    | 3,41           | AI675453  | PLXNA3           | plexina A3  |
|    | 3,40           | AV734194  | DPP8             | dipeptidilpeptidasa 8   |
|    | 3,38           | BC000232  | C5orf18          | marco de lectura abierto 18 del cromosoma 5   |
| 65 | 3,36           | BC001956  | KIAA1961         | Gen KIAA1961  |

ES 2 796 085 T3

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción   |
|----|----------------|-----------|------------------|---|
| 5  | 3,34           | NM_013332 | HIG2             | proteína 2 inducible por hipoxia  |
|    | 3,31           | BC029450  | SLC33A1          | Familia de transportistas de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1                              |
|    | 3,30           | AW008505  | C18orf1          | marco de lectura abierto 1 del cromosoma 18   |
| 10 | 3,29           | BF693956  | CD47             | Antígeno CD47   |
|    | 3,28           | BF677986  | KIAA1961         | Gen KIAA1961  |
|    | 3,27           | A1433691  | CACNA2D4         | canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad alfa 2/delta 4  |
|    | 3,26           | AB014573  | NPHP4            | nefronofosis 4  |
| 15 | 3,25           | AL582804  | LY9              | antígeno linfocitario 9   |
|    | 3,25           | BG236280  | CD86             | Antígeno CD86   |
|    | 3,24           | AA639289  | SLC26A7          | Portador de solutos familia 26, miembro 7   |
|    | 3,24           | NM_005211 | CSF1R            | receptor de factor estimulante de colonias 1  |
| 20 | 3,24           | A1051254  | TRPM2            | canal de catión potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 2                                    |
|    | 3,23           | AW292816  | ABHD2            | dominio de abhidrolasa que contiene 2   |
|    | 3,23           | BC040275  | RASGRF1          | Factor de liberación de nucleótidos de guanina específica de proteína Ras 1                                   |
| 25 | 3,22           | NM_021911 | GABRB2           | receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A, beta 2  |
|    | 3,19           | A1660619  | SLC7A6           | familia portadora de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y +), miembro 6              |
|    | 3,19           | NM_001860 | SLC31A2          | familia de transportistas de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 2                                 |
| 30 | 3,18           | NM_015680 | C2orf24          | marco de lectura abierto 24 del cromosoma 2   |
|    | 3,17           | AW058600  | SLC36A1          | familia portadora de solutos 36   |
|    | 3,16           | AU145049  | HIP1             | Huntingtin que interactúa con la proteína 1   |
|    | 3,15           | NM_005770 | SERF2            | pequeño factor 2 rico en EDRK   |
|    | 3,15           | NM_003566 | EEA1             | Antígeno endosómico precoz 1, 162 kD  |
| 35 | 3,14           | NM_020041 | SLC2A9           | portador de solutos familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 9                                |
|    | 3,14           | W90718    | SLC24A4          | familia portadora de solutos 24   |
|    | 3,13           | A1423165  | TICAM2           | molécula adaptadora del receptor tipo toll 2  |
|    | 3,12           | A1674647  | SPPL2A           | péptido señal similar a peptidasa 2A  |
| 40 | 3,11           | NM_004121 | GGTLA1           | actividad similar a la gamma-glutamyltransferasa 1  |
|    | 3,10           | NM_004546 | NDUFB2           | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 2, 8kDa  |
|    | 3,05           | X15786    | JUBILADO         | protooncogen ret (neoplasia endocrina múltiple y carcinoma medular de tiroides 1, enfermedad de Hirschsprung) |
| 45 | 3,05           | AF181660  | MPZL1            | proteína de mielina cero como 1   |
|    | 3,05           | BG230614  | CD47             | Antígeno CD47 (antígeno relacionado con Rh, transductor de señal asociado a integrina)                        |
|    | 3,00           | A1571996  | STAM2            | molécula adaptadora de transducción de señal (dominio SH3 y motivo ITAM) 2                                    |
| 50 | 2,99           | NM_000201 | ICAM1            | molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor de rinovirus humano                                      |
|    | 2,93           | NM_025244 | TSGA10           | testículo específico, 10  |
|    | 2,93           | AU147538  | PRKCE            | Proteína quinasa C, epsilon   |
| 55 | 2,92           | NM_024576 | OGFRL1           | factor de crecimiento opiode tipo receptor 1  |
|    | 2,91           | A1248055  | ABCC4            | Casete de unión a ATP, subfamilia C (CFTR/MRP), miembro 4   |
|    | 2,86           | AA503877  | CEPT1            | Colina/etanolamina fosfotransferasa 1   |
|    | 2,84           | BC030993  | FLJ21127         | Proteína hipotética FLJ21127  |
| 60 | 2,82           | AA829818  | LY86             | Antígeno linfocitario 86  |
|    | 2,82           | NM_001859 | SLC31A1          | familia de transportistas de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 1                                 |
|    | 2,81           | M74721    | CD79A            | Antígeno CD79A (alfa asociado a inmunoglobulina)  |
| 65 | 2,79           | A1986112  | MGAT4B           | Manosilo (alfa-1,3-)-glicoproteína beta-1,4-N acetilglucosaminiltransferasa, isoenzima B                      |

ES 2 796 085 T3

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción   |
|----|----------------|-----------|------------------|---|
| 5  | 2,79           | NM_030930 | UNC93B1          | unc-93 homólogo B1 ( <i>C. elegans</i> ); homólogo de la unc-93 ( <i>C. elegans</i> ) |
|    | 2,79           | X74039    | PLAUR            | activador de plasminógeno, receptor de uroquinasa                                     |
|    | 2,78           | BF514291  | LY86             | Linfocito antigen 86  |
| 10 | 2,75           | BC005253  | KLHL20           | kelch-like 20 ( <i>Drosophila</i> )   |
|    | 2,73           | AB036432  | AGER             | receptor de glicosilación avanzada específico del producto final                      |
|    | 2,71           | NM_007245 | ATXN2L           | tipo ataxina 2  |
|    | 2,71           | NM_016072 | GOLT1B           | Golgi transporte 1 homólogo B ( <i>S. cerevisiae</i> )                                |
|    | 2,71           | AI453548  | ZDHC8            | dedo de zinc, tipo DHHC que contiene 8  |
| 15 | 2,70           | AI636233  | TMEM8            | proteína transmembrana 8 (cinco dominios que abarcan la membrana)                     |
|    | 2,69           | BE502509  | T3JAM            | TRAF3 interactuando con la proteína 3   |
|    | 2,69           | AW117765  | PEX13            | factor de biogénesis peroxisoma 13  |
|    | 2,69           | AW052216  | IL17RB           | Receptor de interleucina 17 B   |
| 20 | 2,67           | NM_003853 | IL18RAP          | proteína accesoria del receptor de interleucina 18                                    |
|    | 2,66           | NM_002490 | NDUFA6           | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 6, 14kDa                         |
|    | 2,65           | NM_016639 | TNFRSF12A        | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 12A                |
| 25 | 2,65           | AI363185  | FLJ20255         | Proteína hipotética FLJ20255  |
|    | 2,65           | NM_052931 | SLAMF6           | Miembro de la familia SLAM 6  |
|    | 2,65           | AW571669  | TNFRSF19L        | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro tipo 19            |
| 30 | 2,64           | AA654142  | CEECAM1          | molécula de adhesión celular endotelial cerebral 1                                    |
|    | 2,62           | AW510783  | TMEM63A          | proteína transmembrana 63A  |
|    | 2,61           | W95007    | ACSL4            | Acil-CoA sintetasa miembro de la familia de cadena larga 4                            |
|    | 2,60           | S76475    | NTRK3            | tirosina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3                                       |
|    | 2,60           | AJ130713  | SIGLEC7          | lectina 7 similar a Ig que se une al ácido siálico                                    |
| 35 | 2,56           | NM_003775 | EDG6             | diferenciación endotelial, receptor 6 acoplado a proteína G                           |
|    | 2,55           | AI978986  | MAMDC4           | Dominio MAM que contiene 4  |
|    | 2,54           | AF010447  | MR1              | complejo principal de histocompatibilidad, relacionado con la clase I                 |
| 40 | 2,54           | NM_006068 | TLR6             | receptor 6 tipo peaje   |
|    | 2,53           | AF041811  | NTRK3            | tirosina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3                                       |
|    | 2,53           | AW953521  | SERF2; HYPK      | pequeño factor 2 rico en EDRK; Huntingtina interactuando con la proteína K            |
|    | 2,51           | AW293276  | CD53             | Antígeno CD53   |
| 45 | 2,49           | AK023058  | PLXNA2           | Plexina A2  |
|    | 2,49           | AI125204  | C6orf128         | marco de lectura abierto del cromosoma 6 128  |
|    | 2,49           | NM_000392 | ABCC2            | Casete de unión a ATP, subfamilia C (CFTR/MRP), miembro 2                             |
|    | 2,46           | BC032474  | TIRAP            | toll-interleukin 1 receptor (TIR) dominio que contiene proteína adaptadora            |
| 50 | 2,44           | NM_031211 | IMAA             | Pseudogen SLC7A5  |
|    | 2,44           | AI97836   | CD5              | Antígeno CD5 (p56-62)   |
|    | 2,41           | W72082    | C1QR1            | componente complementario 1   |
|    | 2,40           | AA708616  | DPP9             | dipeptidilpeptidasa 9   |
|    | 2,40           | BM987094  | DLGAP4           | discos, proteína 4 grande ( <i>Drosophila</i> ) asociada al homólogo                  |
| 55 | 2,40           | AL713719  | LOC283501        | ATPase, clase VI, tipo 11A  |
|    | 2,39           | AI628734  | PRLR             | receptor de prolactina  |
|    | 2,39           | NM_012110 | CHIC2            | dominio hidrofóbico rico en cisteína 2  |
|    | 2,38           | AK022002  | TFR2             | receptor de transferrina 2  |
| 60 | 2,37           | NM_001555 | IGSF1            | superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 1   |
|    | 2,36           | AA426091  | C19orf15         | marco de lectura abierto del cromosoma 19 15  |
|    | 2,36           | BE547542  | GOPC             | PDZ asociado a Golgi y motivo de bobina en espiral que contiene                       |
|    | 2,36           | NM_004231 | ATP6V1F          | ATPasa, transporte H <sup>+</sup> , lisosomal 14kDa, subunidad V1 F                   |
| 65 | 2,36           | AJ130712  | SIGLEC7          | lectina 7 similar a Ig que se une al ácido siálico                                    |
|    | 2,36           | NM_017905 | TMCO3            | dominios transmembrana y en espiral 3   |

ES 2 796 085 T3

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción   |
|----|----------------|-----------|------------------|---|
| 5  | 2,35           | AB054985  | CACNB1           | canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad beta 1  |
|    | 2,35           | NM_005003 | NDUFAB1          | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1, subcomplejo alfa/beta, 1, 8kDa  |
|    | 2,35           | NM_001251 | CD68             | Antígeno CD68   |
| 10 | 2,35           | AA700869  | PSCD2            | Homología de Pleckstrin, Sec7 y dominios en espiral 2 (citohesina-2)  |
|    | 2,35           | U94903    | CD44             | Antígeno CD44 (función de referencia y sistema de grupo sanguíneo indio)  |
| 15 | 2,35           | NM_003841 | TNFRSF10C        | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10c, señuelo sin dominio intracelular            |
|    | 2,33           | NM_004541 | NDUFA1           | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 1, 7,5kDa  |
|    | 2,33           | BE567130  | KLRK1            | Subfamilia K del receptor tipo lectina de células asesinas, miembro 1   |
| 20 | 2,31           | NM_017460 | CYP3A4           | citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4  |
|    | 2,31           | AI339536  | DSC1             | Desmocollin 1   |
|    | 2,31           | NM_001783 | CD79A            | Antígeno CD79A (alfa asociado a inmunoglobulina); antígeno (alfa asociado a inmunoglobulina)                        |
| 25 | 2,30           | AA333161  | VT11A            | Transporte de vesículas a través de la interacción con t-SNARE homólogo 1A (levadura)                               |
|    | 2,30           | AW134823  | CD6              | Antígeno CD6; Antígeno CD6  |
|    | 2,30           | AL137537  | ATP8B2           | ATPase, Clase I, tipo 8B, miembro 2   |
| 30 | 2,29           | AI671983  | SLC2A9           | portador de solutos familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 9                                      |
|    | 2,29           | AA018187  | C22orf3          | cromosoma 22 marco de lectura abierto 3   |
|    | 2,29           | AL117415  | ADAM33           | ADAM dominio metalopeptidasa 33   |
|    | 2,29           | NM_002588 | PCDHGC3          | subfamilia C de protocadherina gamma  |
| 35 | 2,29           | NM_020960 | GPR107           | Receptor 107 acoplado a proteínas G   |
|    | 2,29           | AK074635  | GENX-3414        | Genetonina 1  |
|    | 2,29           | BE138575  | ITGB5            | Integrina, beta 5   |
|    | 2,28           | NM_003830 | SIGLEC5          | lectina 5 de tipo Ig que se une al ácido siálico; lectina 5 de unión a ácido siálico tipo Ig                        |
| 40 | 2,28           | NM_013319 | UBIAD1           | UbiA dominio prenilttransferasa que contiene 1  |
|    | 2,28           | M63889    | FGFR1            | receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (tirosina quinasa 2 relacionada con fms, síndrome de Pfeiffer) |
|    | 2,27           | H67156    | MSCP             | Portador de solutos familia 25, miembro 37  |
| 45 | 2,27           | BC006215  | SMEK2            | Proteína KIAA1387; Proteína KIAA1387  |
|    | 2,27           | AL109653  | SLITRK2          | Familia tipo SLIT y NTRK, miembro 2   |
|    | 2,27           | NM_007011 | ABHD2            | dominio de abhidrolasa que contiene 2   |
|    | 2,26           | AI767210  | MGC11332         | Proteína hipotética MGC11332  |
|    | 2,26           | BF723605  | NRCAM            | Molécula de adhesión celular neuronal   |
| 50 | 2,26           | R08129    | CDA08            | Proteína inmunomoduladora de células T  |
|    | 2,26           | AF052059  | SEL1L            | sel-1 supresor de lin-12 (C. elegans)   |
|    | 2,26           | NM_005729 | PPIF             | peptidilprolil isomerasa F (ciclofilina F)  |
|    | 2,25           | BE858032  | ARL2L1           | Factor de ribosilación de ADP-like 2-like 1   |
| 55 | 2,25           | AI950390  | C14orf118        | Marco de lectura abierto 118 del cromosoma 14   |
|    | 2,24           | NM_017767 | SLC39A4          | portador de solutos familia 39 (transportador de zinc), miembro 4   |
|    | 2,24           | AL110273  | SPTAN1           | Espectrina, alfa, no eritrocítica 1 (alfa-fodrina)  |
|    | 2,24           | AI077660  | CDA08            | Proteína inmunomoduladora de células T  |
| 60 | 2,23           | AA488687  | SLC7A11          | familia portadora de solutos 7, (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+) miembro 11                    |
|    | 2,23           | NM_000634 | IL8RA            | receptor de interleucina 8, alfa  |
|    | 2,22           | AL390177  | MGC34032         | Familia portadora de solutos 44, miembro 5  |
| 65 | 2,21           | NM_001531 | MR1              | complejo principal de histocompatibilidad, relacionado con la clase I   |

ES 2 796 085 T3

(Continuación)

| Cambio de fold | Genbank | Símbolo genético | Descripción         |   |
|----------------|---------|------------------|---------------------|---|
| 5              | 2,21    | NM_003183        | ADAM17              | ADAM metalopeptidasa dominio 17 (factor de necrosis tumoral, alfa, enzima convertidora)   |
|                | 2,20    | AC003999         | SCAP2               | src fosfoproteína 2 asociada a la familia   |
|                | 2,20    | BC014416         | SLC33A1             | familia de transportistas de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1  |
| 10             | 2,20    | AF226731         | ADORA3              | receptor de adenosina A3  |
|                | 2,19    | AI608725         | ICAM1               | molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor de rinovirus humano  |
| 15             | 2,19    | U41163           | SLC6A8;<br>FLJ43855 | portador de solutos familia 6 (transportador de neurotransmisores, creatina), miembro 8; similar al transportador de creatina dependiente de sodio y cloruro  |
|                | 2,19    | AU147799         | LRRC15              | repetición rica en leucina que contiene 15  |
|                | 2,18    | AW337166         | LOC255104           | Dominios transmembrana y de bobina en espiral 4   |
|                | 2,18    | NM_006505        | PVR                 | receptor de poliovirus  |
| 20             | 2,18    | AI638420         | CLIC4               | canal intracelular de cloruro 4   |
|                | 2,18    | AI167482         | SCUBE3              | Péptido señal, dominio CUB, similar a EGF 3   |
|                | 2,18    | AI739514         | HAS3                | hialuronano sintasa 3   |
|                | 2,18    | NM_005971        | FXD3                | Dominio FXD que contiene el regulador de transporte de iones 3  |
| 25             | 2,17    | AL022398         | TRAF3IP3            | TRAF3 interactuando con la proteína 3   |
|                | 2,17    | U90940           | FCGR2C              | Fc fragmento de IgG, baja afinidad IIc, receptor para (CD32)  |
|                | 2,16    | BC023540         | SORCS1              | Dominio VPS10 relacionado con Sortilin que contiene el receptor 1   |
|                | 2,16    | AV713913         | OSTM1               | proteína transmembrana asociada a osteopetrosis 1   |
| 30             | 2,15    | NM_024505        | NOX5                | NADPH oxidasa, dominio de unión a calcio EF-mano 5  |
|                | 2,15    | BC006178         | SEC22L3             | Vesículas SEC22 que trafican con proteínas 3 (S. cerevisiae); Tráfico de vesículas SEC22 similar a proteínas 3 (S. cerevisiae)  |
| 35             | 2,15    | BG151527         | GRIK5               | receptor de glutamato, ionotrópico, kainato 5   |
|                | 2,14    | AW001754         | NEGR1               | regulador de crecimiento neuronal 1   |
|                | 2,14    | NM_013979        | BNIP1               | BCL2/adenovirus E1B 19kDa proteína interactuante 1  |
|                | 2,14    | NM_018643        | TREM1               | receptor desencadenante expresado en células mieloides 1  |
|                | 2,12    | NM_005284        | GPR6                | Receptor 6 acoplado a proteínas G   |
| 40             | 2,11    | AA454190         | ZDHHC20             | dedo de zinc, tipo DHC que contiene 20  |
|                | 2,11    | AB048796         | TMPRSS13            | proteasa transmembrana, serina 13   |
|                | 2,11    | AL044520         | NYD-SP21            | testículos relacionados con el desarrollo NYD-SP21  |
|                | 2,11    | BE463930         | TMAP1               | Remodelación matricial asociada 7   |
| 45             | 2,10    | NM_152264        | SLC39A13            | portador de solutos familia 39 (transportador de zinc), miembro 13  |
|                | 2,08    | AL530874         | EPHB2               | Receptor de EPH B2  |
|                | 2,07    | NM_018668        | VPS33B              | clasificación de proteínas vacuolares 33B (levadura)  |
|                | 2,07    | NM_024531        | GPR172A             | Receptor 172A acoplado a proteínas G  |
| 50             | 2,07    | NM_023038        | ADAM19              | ADAM metalopeptidasa dominio 19 (meltrin beta)  |
|                | 2,07    | BC001281         | TNFRSF10B           | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10b  |
|                | 2,07    | AF217749         | PCDHB9              | protocadherin beta 9  |
| 55             | 2,06    | AB030077         | FGFR2               | receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (quinasa expresada en bacterias, receptor del factor de crecimiento de queratinocitos, disostosis craneofacial 1, síndrome de Crozon, síndrome de Pfeiffer, síndrome de Jackson-Weiss) |
|                | 2,06    | AL137432         | SUSD1               | dominio de sushi que contiene 1   |
| 60             | 2,05    | NM_004518        | KCNQ2               | canal dependiente de voltaje de potasio, subfamilia similar a KQT, miembro 2  |
|                | 2,04    | AI672363         | VPS33B              | clasificación de proteínas vacuolares 33B (levadura)  |
|                | 2,04    | NM_006671        | SLC1A7              | portador de solutos familia 1 (transportador de glutamato), miembro 7   |
|                | 2,03    | AA215519         | DLGAP1              | Discos, proteína grande (Drosophila) asociada al homólogo 1   |
| 65             | 2,02    | NM_004648        | PTPNS1              | proteína tirosina fosfatasa, sustrato de tipo no receptor 1   |

(Continuación)

| Cambio de fold | Genbank | Símbolo genético | Descripción |  |
|----------------|---------|------------------|-------------|--|
| 5              | 2,02    | NM_002564        | P2RY2       | receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 2   |
|                | 2,01    | BF511678         | SCUBE3      | Péptido señal, dominio CUB, similar a EGF 3          |
|                | 2,01    | BC013385         | CLEC7A      | Familia de dominio de lectina de tipo C 7, miembro A |

10

Tabla 2

| Cambio de fold | Genbank | Símbolo genético | Descripción        |  |
|----------------|---------|------------------|--------------------|--|
| 15             | 57,47   | NM_005816        | CD96               | Antígeno CD96  |
|                | 32,36   | AF348078         | SUCNR1             | receptor 1 de succinato  |
|                | 30,96   | NM_002182        | IL1 RAP            | proteína accesoria del receptor de interleucina 1                              |
|                | 27,55   | NM_003332        | TYROBP             | Proteína de unión a la proteína tirosina quinasa TYRO                          |
|                | 26,88   | NM_004271        | LY86               | antígeno linfocitario 86   |
|                | 20,96   | NM_014879        | P2RY14             | receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 14                            |
| 20             | 18,38   | NM_005048        | PTHR2              | receptor 2 de la hormona paratiroidea  |
|                | 17,73   | AI625747         | ADRB1              | Adrenérgico, beta-1-, receptor   |
|                | 17,36   | NM_015376        | RASGRP3            | Proteína liberadora de guanilo RAS 3 (calcio y                                 |
|                | 16,84   | U62027           | C3AR1              | componente complementario 3a receptor 1  |
|                | 14,49   | AW025572         | HAVCR2             | virus de la hepatitis A receptor celular 2                                     |
|                | 12,48   | AF285447         | HCST               | transductor de señal de células hematopoyéticas                                |
| 25             | 11,92   | AI805323         | LGR7               | Receptor 7 acoplado a proteínas G que contiene repeticiones rico en leucina    |
|                | 11,67   | NM_001197        | BIK                | Asesino que interactúa con BCL2 (inductor de apoptosis)                        |
|                | 11,53   | NM_018092        | NETO2              | neuropilina (NRP) y tolloide (TLL) -como 2                                     |
|                | 11,07   | N74607           | AQP3               | aquaporin 3  |
|                | 10,48   | NM_001769        | CD9                | Antígeno CD9 (p24)   |
|                | 8,77    | NM_005582        | CD180              | Antígeno CD180   |
| 30             | 7,46    | AF039686         | GPR34              | Receptor acoplado a proteínas G 34   |
|                | 7,19    | AJ277151         | TNFRSF4            | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 4           |
|                | 6,85    | AA888858         | PDE3B              | Fosfodiesterasa 3B, inhibida por cGMP  |
|                | 6,80    | AU149572         | ADCY2              | adenilato ciclasa 2 (cerebro)  |
|                | 6,80    | NM_002299        | LCT                | lactasa  |
| 35             | 6,58    | NM_005296        | GPR23              | G protein-coupled receptor 23  |
|                | 6,45    | NM_004106        | FCER1G             | Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide           |
|                | 6,25    | AW406569         | MGC15619           | hypothetical protein MGC15619  |
|                | 6,06    | M81695           | ITGAX              | integrin, alpha X (antigen CD11C (p150), alpha polypeptide)                    |
|                | 5,92    | NM_003494        | DYSF               | dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B recessive)                        |
|                | 5,75    | NM_013447        | EMR2               | egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2                |
| 40             | 5,62    | NM_017806        | LIME1              | Lck interacting transmembrane adaptor 1  |
|                | 5,62    | AK092824         | AMN                | Amnionless homolog (mouse)   |
|                | 5,59    | AF345567         | GPR174             | G protein-coupled receptor 174   |
|                | 5,26    | L03419           | FCGR1A ; LOC440607 | Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64) ; Fc-gamma receptor I B2 |
| 45             | 5,18    | AF015524         | CCRL2              | chemokine (C-C motif) receptor-like 2  |
|                | 5,13    | AA631143         | SLC45A3            | solute carrier family 45, member 3   |
|                | 5,10    | AJ240085         | TRAT1              | T cell receptor associated transmembrane adaptor 1                             |
|                | 5,05    | AW183080         | GPR92              | G protein-coupled receptor 92  |
|                | 5,03    | NM_002120        | HLA-DOB            | major histocompatibility complex, class II, DO                                 |
|                | 5,03    | NM_015364        | LY96               | lymphocyte antigen 96  |

50

Tabla 3

| Cambio de fold | Genbank | Símbolo genético | Descripción |   |
|----------------|---------|------------------|-------------|---|
| 55             | 57,47   | NM_005816        | CD96        | Antígeno CD96   |
|                | 32,36   | AF348078         | SUCNR1      | receptor 1 de succinato   |
|                | 30,96   | NM_002182        | IL1 RAP     | proteína accesoria del receptor de interleucina 1                           |
|                | 27,55   | NM_003332        | TYROBP      | Proteína de unión a la proteína tirosina quinasa TYRO                       |
|                | 26,88   | NM_004271        | LY86        | antígeno linfocitario 86  |
|                | 20,96   | NM_014879        | P2RY14      | receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 14                         |
| 60             | 18,38   | NM_005048        | PTHR2       | receptor 2 de la hormona paratiroidea                                       |
|                | 17,73   | AI625747         | ADRB1       | Adrenérgico, beta-1-, receptor  |
|                | 17,36   | NM_015376        | RASGRP3     | Proteína liberadora de guanilo RAS 3 (calcio y                              |
|                | 16,84   | U62027           | C3AR1       | componente complementario 3a receptor 1                                     |
|                | 14,49   | AW025572         | HAVCR2      | virus de la hepatitis A receptor celular 2                                  |
|                | 12,48   | AF285447         | HCST        | transductor de señal de células hematopoyéticas                             |
| 65             | 11,92   | AI805323         | LGR7        | Receptor 7 acoplado a proteínas G que contiene repeticiones rico en leucina |

ES 2 796 085 T3

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético      | Descripción   |   |
|----|----------------|-----------|-----------------------|---|---|
| 5  | 11,67          | NM_001197 | BIK                   | Asesino que interactúa con BCL2 (inductor de apoptosis)   |   |
|    | 11,53          | NM_018092 | NETO2                 | neuropilina (NRP) y tolloide (TLL) 2  |   |
|    | 11,07          | N74607    | AQP3                  | aquaporin 3   |   |
|    | 10,88          | BF439675  | CD69                  | Antígeno CD69 (p60, antígeno de activación de células T temprano)   |   |
| 10 | 10,48          | NM_001769 | CD9                   | Antígeno CD9 (p24)  |   |
|    | 9,52           | AA814140  | C5orf18               | marco de lectura abierto 18 del cromosoma 5   |   |
|    | 8,77           | NM_005582 | CD180                 | Antígeno CD180  |   |
|    | 7,46           | AF039686  | GPR34                 | Receptor acoplado a proteínas G 34  |   |
|    | 7,30           | AI056776  | ITGA6                 | Integrina, alfa 6   |   |
|    | 7,19           | AJ277151  | TNFRSF4               | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 4  |   |
|    | 6,99           | AI738675  | SELPLG                | Selectina P ligando   |   |
| 15 | 6,85           | AA888858  | PDE3B                 | Fosfodiesterasa 3B, inhibida por cGMP   |   |
|    | 6,80           | AU149572  | ADCY2                 | adenilato ciclasa 2 (cerebro)   |   |
|    | 6,80           | NM_002299 | LCT                   | lactasa   |   |
|    | 6,58           | NM_005296 | GPR23                 | Receptor 23 acoplado a proteínas G  |   |
|    | 6,45           | NM_004106 | FCER1G                | Fc fragmento de IgE, alta afinidad I, receptor para; gama polipéptido   |   |
| 20 | 6,25           | AW406569  | MGC15619              | proteína hipotética MGC15619  |   |
|    | 6,06           | M81695    | ITGAX                 | integrina, alfa X (antígeno CD11C (p150), polipéptido alfa)   |   |
|    | 5,92           | NM_003494 | DYSF                  | dysferlin, distrofia muscular de la cintura escapular 2B recesiva)  |   |
|    | 5,85           | AI860212  | PAG1                  | fosfoproteína asociada con glucosfingolípidos microdominios 1   |   |
|    | 5,75           | NM_013447 | EMR2                  | módulo tipo egf que contiene, tipo mucina, tipo receptor de hormona 2   |   |
|    | 5,62           | NM_017806 | LIME1                 | Adaptador transmembrana interactivo Lck 1   |   |
| 25 | 5,62           | AK092824  | AMN                   | Homólogo sin amnios (ratón)   |   |
|    | 5,59           | AF345567  | GPR174                | Receptor 174 acoplado a proteínas G   |   |
|    | 5,26           | L03419    | FCGR1A ;<br>LOC440607 | Fc fragmento de IgG, receptor de alta afinidad Ia (CD64); Fc-gamma receptor I B2  |   |
| 30 | 5,24           | BG230586  | SLC7A6                | familia portadora de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, y + sistema), miembro 6                          |   |
|    | 5,18           | AF015524  | CCRL2                 | quimiocina (motivo C-C) tipo receptor 2   |   |
|    | 5,13           | AA631143  | SLC45A3               | familia portadora de solutos 45, miembro 3  |   |
|    | 5,10           | AJ240085  | TRAT1                 | Adaptador transmembrana asociado a receptor de células T 1  |   |
|    | 5,05           | AW183080  | GPR92                 | Receptor 92 acoplado a proteínas G  |   |
|    | 5,03           | NM_002120 | HLA-DOB               | complejo principal de histocompatibilidad, clase II, OD beta  |   |
|    | 5,03           | NM_015364 | LY96                  | antígeno linfocitario 96  |   |
|    | 4,90           | NM_020399 | GOPC                  | PDZ asociado a Golgi y motivo de bobina en espiral que contiene   |   |
| 40 | 4,88           | AK026133  | SEMA4B                | dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), transmembrana dominio (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 4B |   |
|    | 4,88           | BC041664  | VMD2                  | distrofia macular viteliforme 2 (mejor enfermedad, bestrofina)  |   |
|    | 4,85           | NM_152592 | C14orf49              | marco de lectura abierto 49 del cromosoma 14  |   |
|    | 4,85           | AA923524  | RASGRP4               | Proteína liberadora de guanilo RAS 4  |   |
|    | 4,85           | BC008777  | ITGAL                 | integrina alfa L (antígeno CD11A (p180))  |   |
|    | 4,67           | AF014403  | PPAP2A                | ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2A   |   |
|    | 4,65           | AK097698  | SORCS2                | Dominio VPS10 relacionado con Sortilin que contiene el receptor 2   |   |
|    | 4,63           | X14355    | FCGR1A                | Fc fragmento de IgG, receptor de alta afinidad Ia (CD64)  |   |
|    | 4,55           | NM_001629 | ALOX5AP               | proteína activadora de 5-lipoxigenasa de araquidonato   |   |
|    | 4,50           | AU155968  | C18orf1               | marco de lectura abierta 1 del cromosoma 18   |   |
| 45 | 4,44           | AK075092  | HERV-FRD              | Proteína HERV-FRD ancestral Env poliproteína  |   |
|    | 4,42           | NM_020960 | GPR107                | Receptor 107 acoplado a proteínas G   |   |
|    | 4,37           | BC000039  | FAM26B                | familia con similitud de secuencia 26, miembro B  |   |
|    | 4,35           | NM_153701 | IL12RB1               | receptor de interleucina 12, beta 1   |   |
|    | 4,35           | AI762344  | PTGER1                | receptor 1 de prostaglandina E (subtipo EP1), 42 kDa  |   |
|    | 4,31           | NM_006459 | SPFH1                 | Familia de dominio SPFH, miembro 1  |   |
|    | 4,27           | NM_003126 | SPTA1                 | espectrina, alfa, eritrocítico 1 (eliptocitosis 2)  |   |
| 50 | 4,22           | AL518391  | AQP1                  | aquaporina 1 (proteína integral formadora de canales, 28 kDa)   |   |
|    | 4,12           | AK026188  | PCDHGC3               | subfamilia C de protocadherina gamma  |   |
|    | 4,10           | AU146685  | EDG2                  | Diferenciación endotelial, receptor G-proteincoupled del ácido lisofosfatídico, 2   |   |
|    | 55             | 4,05      | BE673587              | SLC14A1   | Familia portadora de solutos 14 (transportador de urea), miembro 1 (Kidd grupo sanguíneo) |
|    |                | 4,02      | BF129969              | TSPAN2  | tetraspanina 2  |
|    |                | 4,00      | AW243272              | KCNK5   | Canal de potasio, subfamilia K, miembro 5   |
| 60 | 3,98           | T68858    | DHRS3                 | Miembro 3 de deshidrogenasa / reductasa (familia SDR)   |   |
|    | 3,94           | AI827849  | VTI1A                 | Transporte de vesículas a través de la interacción con t-SNARE homólogo 1A (levadura)                                     |   |
|    | 3,86           | AL134012  | NRXN2                 | Neurexina 2   |   |
|    | 3,83           | BG230614  | CD47                  | Antígeno CD47 (antígeno relacionado con Rh, señal asociada a integrina transductor)                                       |   |
| 65 | 3,80           | AI869717  | MGC15523              | proteína hipotética MGC15523  |   |
|    | 3,80           | AI458583  | SIMP                  | Fuente de péptidos inmunodominantes asociados a MHC   |   |

# ES 2 796 085 T3

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción   |
|----|----------------|-----------|------------------|---|
| 5  | 3,79           | NM_002183 | IL3RA            | receptor de interleucina 3, alfa (baja afinidad)  |
|    | 3,79           | AA608820  | NRXN2            | neurexina 2   |
|    | 3,73           | NM_000206 | IL2RG            | receptor de interleucina 2, gamma (inmunodeficiencia combinada grave)   |
|    | 3,72           | BC002737  | VAMP2            | proteína de membrana asociada a vesícula 2 (sinaptobrevina 2)   |
|    | 3,72           | BC005884  | BID              | Agonista de la muerte del dominio que interactúa BH3; Dominio interactivo BH3 agonista de la muerte   |
| 10 | 3,68           | AI688418  | PLXNA2           | plexina A2  |
|    | 3,68           | BC003105  | PTP4A3           | proteína tirosina fosfatasa tipo IVA, miembro 3   |
|    | 3,68           | NM_001772 | CD33             | Antígeno CD33 (gp67)  |
|    | 3,66           | AI955119  | VAMP2            | proteína de membrana asociada a vesícula 2 (sinaptobrevina 2)   |
|    | 3,65           | BC007524  | SPAG9            | esperma asociado antígeno 9   |
| 15 | 3,64           | AI344200  | SLC25A35         | portador de solutos familia 25, miembro 35  |
|    | 3,64           | BC005253  | KLHL20           | kelch 20 (Drosophila)   |
|    | 3,58           | BF381837  | C20orf52         | marco de lectura abierto 52 del cromosoma 20  |
|    | 3,51           | NM_002886 | RAP2A;<br>RAP2B  | RAP2A, miembro de la familia de oncogenes RAS; RAP2B, miembro de la familia de oncogenes RAS  |
|    | 3,50           | NM_007063 | TBC1D8           | Familia de dominio TBC1, miembro 8 (con GRAM)   |
| 20 | 3,45           | AK027160  | BCL2L11          | BCL2 11 (facilitador de apoptosis)  |
|    | 3,44           | BF055366  | EDG2             | diferenciación endotelial, receptor acoplado a proteína G de ácido lisofosfatídico, 2   |
|    | 3,42           | NM_003608 | GPR65            | Receptor 65 acoplado a proteínas G  |
|    | 3,41           | AI675453  | PLXNA3           | plexina A3  |
|    | 3,40           | AV734194  | DPP8             | dipeptidilpeptidasa 8   |
| 25 | 3,36           | BC001956  | KIAA1961         | Gen KIAA1961  |
|    | 3,34           | NM_013332 | HIG2             | proteína inducible por hipoxia 2  |
|    | 3,31           | BC029450  | SLC33A1          | Familia de transportistas de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1  |
|    | 3,28           | BF677986  | KIAA1961         | Gen KIAA1961  |
|    | 3,27           | AI433691  | CACNA2D4         | canal de calcio, dependiente de voltaje, subunidad alfa 2/delta 4   |
| 30 | 3,26           | AB014573  | NPHP4            | nefronofisis 4  |
|    | 3,25           | AL582804  | LY9              | antígeno linfocitario 9   |
|    | 3,25           | BG236280  | CD86             | Antígeno CD86 (antígeno CD28 ligando 2, antígeno B7-2)  |
|    | 3,24           | AA639289  | SLC26A7          | Portador de solutos familia 26, miembro 7   |
|    | 3,24           | NM_005211 | CSF1R            | receptor del factor 1 estimulante de colonias, anteriormente sarcoma felino homólogo de oncogén viral (v-fms); factor estimulante de colonias 1 |
| 35 |                |           |                  | receptor, anteriormente sarcoma felino viral de McDonough viral (v-fms) homólogo oncogénico   |
|    | 3,24           | AI051254  | TRPM2            | canal de catión potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 2  |
|    | 3,23           | AW292816  | ABHD2            | dominio de abhidrolasa que contiene 2   |
|    | 3,23           | BC040275  | RASGRF1          | Factor de liberación de nucleótidos de guanina específica de proteína Ras 1   |
|    | 3,22           | NM_021911 | GABRB2           | receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A, 2   |
| 40 | 3,19           | AI660619  | SLC7A6           | familia portadora de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, y + sistema), miembro 6  |
|    | 3,19           | NM_001860 | SLC31A2          | familia de transportistas de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 2   |
|    | 3,18           | NM_015680 | C2orf24          | marco de lectura abierto 24 del cromosoma 2   |
|    | 3,17           | AW058600  | SLC36A1          | familia de portadores de solutos 36 (simportador de protones/aminoácidos), miembro 1  |
|    | 3,16           | AU145049  | HIP1             | Huntingtin que interactúa con la proteína 1   |
| 45 | 3,15           | NM_005770 | SERF2            | pequeño factor 2 rico en EDRK   |
|    | 3,15           | NM_003566 | EEA1             | Antígeno endosómico precoz 1, 162 kD  |
|    | 3,14           | NM_020041 | SLC2A9           | portador de solutos familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 9  |
|    | 3,14           | W90718    | SLC24A4          | familia portadora de solutos 24 (sodio / potasio/calcio intercambiador), miembro 4  |
|    | 3,13           | AI423165  | TICAM2           | molécula adaptadora del receptor tipo toll 2  |
| 50 | 3,12           | AI674647  | SPPL2A           | péptido señal similar a peptidasa 2A  |
|    | 3,11           | NM_004121 | GGTLA1           | Actividad similar a la gamma-glutamyltransferasa 1  |
|    | 3,10           | NM_004546 | NDUFB2           | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 2, 8kDa  |
|    | 3,05           | X15786    | RET              | ret protooncogen (neoplasia endocrina múltiple y carcinoma medular de tiroides 1, enfermedad de Hirschsprung)                                   |
|    | 3,05           | AF181660  | MPZL1            | proteína de mielina cero 1  |
| 55 | 3,00           | AI571996  | STAM2            | molécula adaptadora de transducción de señal (dominio SH3 e ITAM motivo) 2  |
|    | 2,99           | NM_000201 | ICAM1            | molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor rinovirus humano   |
|    | 2,93           | NM_025244 | TSGA10           | testículo específico, 10  |
|    | 2,93           | AU147538  | PRKCE            | Proteína quinasa C, epsilon   |
|    | 2,92           | NM_024576 | OGFRL1           | factor de crecimiento opiode tipo receptor 1  |
| 60 | 2,91           | AI248055  | ABCC4            | Casete de unión a ATP, subfamilia C (CFTR / MRP), miembro 4   |
|    | 2,86           | AA503877  | CEPT1            | Colina/etanolamina fosfotransferasa 1   |
|    | 2,84           | BC030993  | FLJ21127         | Proteína hipotética FLJ21127  |
|    | 2,82           | NM_001859 | SLC31A1          | familia de transportistas de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 1   |
|    | 2,81           | M74721    | CD79A            | Antígeno CD79A (alfa asociado a inmunoglobulina)  |
| 65 | 2,79           | AI986112  | MGAT4B           | Manonosilo (alfa-1,3-)- glicoproteína beta-1,4-nacetilglucosaminiltransferasa, isoenzima B  |
|    | 2,79           | NM_030930 | UNC93B1          | unc-93 homólogo B1 (C. elegans); unc-93 homólogo B1 (C. elegans)  |
|    | 2,79           | X74039    | PLAUR            | activador de plasminógeno, receptor de uroquinasa   |

ES 2 796 085 T3

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético   | Descripción   |
|----|----------------|-----------|--|---|
| 5  | 2,75           | BC005253  | KLHL20   | kelch 20 (Drosophila)   |
|    | 2,73           | AB036432  | AGER   | receptor de glicosilación avanzada específico del producto final  |
|    | 2,71           | NM_007245 | ATXN2L   | ataxina 2   |
|    | 2,71           | NM_016072 | GOLT1B   | Golgi transporte 1 homólogo B (S. cerevisiae)   |
|    | 2,71           | AI453548  | ZDHHC8   | dedo de zinc, tipo DHHC que contiene 8  |
| 10 | 2,70           | AI636233  | TMEM8  | proteína 8 transmembrana (cinco dominios que abarcan la membrana)   |
|    | 2,69           | BE502509  | T3JAM  | TRAF3 que interactúa con la proteína 3  |
|    | 2,69           | AW117765  | PEX13  | factor de biogénesis peroxisoma 13  |
|    | 2,69           | AW052216  | IL17RB   | Receptor de interleucina 17 B   |
|    | 2,67           | NM_003853 | IL18RAP  | proteína accesoria del receptor de interleucina 18  |
|    | 2,66           | NM_002490 | NDUFA6   | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 6, 14kDa   |
| 15 | 2,65           | NM_016639 | TNFRSF12A  | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 12A  |
|    | 2,65           | AI363185  | FLJ20255   | Proteína hipotética FLJ20255  |
|    | 2,65           | NM_052931 | SLAMF6   | Miembro de la familia SLAM 6  |
|    | 2,65           | AW571669  | TNFRSF19L  | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro tipo 19  |
|    | 2,64           | AA654142  | CEECAM1  | molécula de adhesión celular endotelial cerebral 1  |
|    | 2,62           | AW510783  | TMEM63A  | proteína transmembrana 63A  |
| 20 | 2,61           | W95007    | ACSL4  | Acil-CoA sintetasa miembro de la familia de cadena larga 4  |
|    | 2,60           | S76475    | NTRK3  | tirosina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3   |
|    | 2,60           | AJ130713  | SIGLEC7  | lectina 7 similar a Ig que se une al ácido siálico  |
|    | 2,56           | NM_003775 | EDG6   | diferenciación endotelial, receptor 6 acoplado a proteína G   |
|    | 2,55           | AI978986  | MAMDC4   | Dominio MAM que contiene 4  |
|    | 2,54           | AF010447  | MR1  | complejo principal de histocompatibilidad, relacionado con la clase I   |
| 25 | 2,54           | NM_006068 | TLR6   | receptor 6 tipo toll  |
|    | 2,53           | AF041811  | NTRK3  | tirosina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3   |
|    | 2,53           | AW953521  | SERF2 ;<br>HYPK  | pequeño factor 2 rico en EDRK; Huntingtina interactuando con la proteína K  |
|    | 2,51           | AW293276  | CD53   | Antígeno CD53   |
| 30 | 2,49           | AK023058  | PLXNA2   | Plexina A2  |
|    | 2,49           | AI125204  | C6orf128   | marco de lectura abierto del cromosoma 6 128  |
|    | 2,49           | NM_000392 | ABCC2  | Casete de unión a ATP, subfamilia C (CFTR / MRP), miembro 2   |
|    | 2,46           | BC032474  | TIRAP  | toll-interleukin 1 receptor proteína que contiene un adaptador que contiene el dominio  |
| 35 | 2,44           | NM_031211 | IMAA;<br>LOC388221;<br>LOC440345;<br>LOC440354;<br>LOC595101;<br>LOC641298 | Pseudogen SLC7A5; Pseudogen SLC7A5; NPIP locus Locus tipo NPIP; proteína hipotética LOC440345; proteína hipotética LOC440345; PI-3-quinasa relacionada con la quinasa Pseudogen SMG-1; PI-3-quinasa relacionada con la quinasa SMG-1 Pseudogene; P-seudogen de la quinasa relacionada con PI-3-quinasa SMG-1; P-seudogen de la quinasa relacionada con PI-3-quinasa SMG-1; Quinasa relacionada con PI-3-quinasa SMG-1 - como locus; PI-3-quinasa relacionada con la quinasa |
| 40 | 2,44           | AI797836  | CD5  | SMG-1 locus   |
|    | 2,41           | W72082    | C1QR1  | Antígeno CD5 (p56-62)   |
|    | 2,40           | AA708616  | DPP9   | componente 1 del complemento, subcomponente q, receptor 1;  |
| 45 | 2,40           | BM987094  | DLGAP4   | Complemento componente 1, subcomponente q, receptor 1   |
|    | 2,40           | AL713719  | LOC283501  | dipeptidilpeptidasa 9   |
|    | 2,39           | AI628734  | PRLR   | discos, proteína 4 grande (Drosophila) asociada al homólogo   |
|    | 2,39           | NM_012110 | CHIC2  | ATPase, clase VI, tipo 11A  |
|    | 2,38           | AK022002  | TFR2   | receptor de prolactina  |
|    | 2,37           | NM_001555 | IGSF1  | dominio hidrofóbico rico en cisteína 2  |
| 50 | 2,36           | AA426091  | C19orf15   | receptor de transferrina 2  |
|    | 2,36           | BE547542  | GOPC   | superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 1   |
|    | 2,36           | NM_004231 | ATP6V1F  | marco de lectura abierto del cromosoma 19 15  |
|    | 2,36           | AJ130712  | SIGLEC7  | PDZ asociado a Golgi y motivo de bobina en espiral que contiene   |
|    | 2,36           | NM_017905 | TMCO3  | ATPasa, transporte H <sup>+</sup> , lisosomal 14kDa, subunidad V1 F   |
| 55 | 2,35           | AB054985  | CACNB1   | lectina 7 similar a Ig que se une al ácido siálico  |
|    | 2,35           | NM_005003 | NDUFAB1  | dominios transmembrana y en espiral 3   |
|    | 2,35           | NM_001251 | CD68   | canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad beta 1  |
|    | 2,35           | AA700869  | PSCD2  | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1, subcomplejo alfa/beta, 1,8kDa   |
|    | 2,35           | U94903    | CD44   | Antígeno CD68   |
|    | 2,35           | NM_003841 | TNFRSF10C  | Homología de Pleckstrin, Sec7 y dominios en espiral 2 (citohesina-2)  |
| 60 | 2,33           | NM_004541 | NDUFA1   | Antígeno CD44 (función de búsqueda y sistema de grupos sanguíneos indios)   |
|    | 2,33           | BE567130  | KLRK1  | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10c,   |
|    | 2,31           | NM_017460 | CYP3A4   | señuelo sin un dominio intracelular   |
|    | 2,31           | AI339536  | DSC1   | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 1, 7.5kDa  |
| 65 |                |           |  | Subfamilia K del receptor tipo lectina de células asesinas, miembro 1   |
|    |                |           |  | citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4  |
|    |                |           |  | Desmocolina 1   |

ES 2 796 085 T3

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción   |
|----|----------------|-----------|------------------|---|
| 5  | 2,31           | NM_001783 | CD79A            | Antígeno CD79A (alfa asociado a inmunoglobulina); CD79A antígeno (alfa asociado a inmunoglobulina)                  |
|    | 2,30           | AA333161  | VTI1A            | Transporte de vesículas a través de la interacción con t-SNARE homólogo 1A (levadura)                               |
|    | 2,30           | AW134823  | CD6              | Antígeno CD6; Antígeno CD6  |
| 10 | 2,30           | AL137537  | ATP8B2           | ATPase, Clase I, tipo 8B, miembro 2   |
|    | 2,29           | AI671983  | SLC2A9           | portador de solutos familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 9                                      |
|    | 2,29           | AA018187  | C22orf3          | cromosoma 22 marco de lectura abierto 3   |
|    | 2,29           | AL117415  | ADAM33           | ADAM dominio metalopeptidasa 33   |
|    | 2,29           | NM_002588 | PCDHGC3;         | subfamilia de protocadherina gamma C, 3; protocadherina gamma   |
| 15 |                |           | PCDHGB4;         | subfamilia B, 4; subfamilia de protocadherina gamma A, 8;   |
|    |                |           | PCDHGA8;         | subfamilia A de protocadherina gamma, 12; protocadherina gamma  |
|    |                |           | PCDHGA12;        | subfamilia C, 5; subfamilia de protocadherina gamma C, 4;   |
|    |                |           | PCDHGC5;         | subfamilia B de protocadherina gamma, 7; protocadherina gamma   |
|    |                |           | PCDHGC4;         | subfamilia B, 6; subfamilia B de protocadherina gamma, 5;   |
|    |                |           | PCDHGB7;         | subfamilia B de protocadherina gamma, 3; protocadherina gamma   |
| 20 |                |           | PCDHGB6;         | subfamilia B, 2; subfamilia B de protocadherina gamma, 1;   |
|    |                |           | PCDHGB5;         | subfamilia de protocadherina gamma A, 11; protocadherina gamma  |
|    |                |           | PCDHGB3;         | subfamilia A, 10; subfamilia de protocadherina gamma A, 9;  |
|    |                |           | PCDHGB2;         | subfamilia de protocadherina gamma A, 7; protocadherina gamma   |
|    |                |           | PCDHGB1;         | subfamilia A, 6; subfamilia de protocadherina gamma A, 5;   |
|    |                |           | PCDHGA11;        | subfamilia de protocadherina gamma A, 4; protocadherina gamma   |
| 25 |                |           | PCDHGA10;        | subfamilia A, 3; subfamilia A de protocadherina gamma, 2;   |
|    |                |           | PCDHGA9;         | subfamilia A de protocadherina gamma, 1   |
|    |                |           | PCDHGA7;         |   |
|    |                |           | PCDHGA6;         |   |
|    |                |           | PCDHGA5;         |   |
|    |                |           | PCDHGA4;         |   |
| 30 |                |           | PCDHGA3;         |   |
|    |                |           | PCDHGA2;         |   |
|    |                |           | PCDHGA1          |   |
|    | 2,29           | NM_020960 | GPR107           | Receptor 107 acoplado a proteínas G   |
|    | 2,29           | AK074635  | GENX-3414        | Genethonin 1  |
|    | 2,29           | BE138575  | ITGB5            | Integrina, beta 5   |
| 35 | 2,28           | NM_003830 | SIGLEC5          | lectina 5 de tipo Ig que se une al ácido siálico; lectina similar a Ig que se une al ácido siálico 5                |
|    | 2,28           | NM_013319 | UBIAD1           | UbiA dominio preniltransferasa que contiene 1   |
|    | 2,28           | M63889    | FGFR1            | receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (tirosina quinasa relacionada con fms 2, síndrome de Pfeiffer) |
| 40 | 2,27           | H67156    | MSCP             | Portador de solutos familia 25, miembro 37  |
|    | 2,27           | BC006215  | SMEK2            | Proteína KIAA1387; Proteína KIAA1387  |
|    | 2,27           | AL109653  | SLITRK2          | Familia tipo SLIT y NTRK, miembro 2   |
|    | 2,27           | NM_007011 | ABHD2            | dominio de abhidrolasa que contiene 2   |
|    | 2,26           | AI767210  | MGC11332         | Proteína hipotética MGC11332  |
|    | 2,26           | BF723605  | NRCAM            | Molécula de adhesión celular neuronal   |
| 45 | 2,26           | R08129    | CDA08            | Proteína inmunomoduladora de células T  |
|    | 2,26           | AF052059  | SEL1L            | sel-1 supresor de lin-12 (C. elegans)   |
|    | 2,26           | NM_005729 | PPIF             | peptidilprolil isomerasa F (ciclofilina F)  |
|    | 2,25           | BE858032  | ARL2L1           | Factor de ribosilación de ADP 2 1   |
|    | 2,25           | AI950390  | C14orf118        | Marco de lectura abierto del cromosoma 14 118   |
|    | 2,24           | NM_017767 | SLC39A4          | portador de solutos familia 39 (transportador de zinc), miembro   |
| 50 | 2,24           | AL110273  | SPTAN1           | Espectrina alfa, no eritrocítica 1 (alfa-fodrina)   |
|    | 2,24           | AI077660  | CDA08            | Proteína inmunomoduladora de células T  |
|    | 2,23           | AA488687  | SLC7A11          | familia portadora de solutos 7, (transportador de aminoácidos catiónicos, y + sistema) miembro 11                   |
|    | 2,23           | NM_000634 | IL8RA            | receptor de interleucina 8, alfa  |
|    | 2,22           | AL390177  | MGC34032         | Familia portadora de solutos 44, miembro 5  |
| 55 | 2,21           | NM_001531 | MR1              | complejo principal de histocompatibilidad, relacionado con la clase I   |
|    | 2,21           | NM_003183 | ADAM17           | ADAM metalopeptidasa dominio 17 (factor de necrosis tumoral,  |
|    | 2,20           | AC003999  | SCAP2            | alfa, enzima convertidora)  |
|    | 2,20           | BC014416  | SLC33A1          | src fosfoproteína 2 asociada a la familia   |
|    | 2,20           | AF226731  | ADORA3           | familia portadora de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1  |
| 60 |                |           |                  | receptor de adenosina A3  |
|    | 2,19           | AI608725  | ICAM1            | molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor de rinovirus humano  |
|    | 2,19           | U41163    | SLC6A8;          | portador de solutos familia 6 (transportador de neurotransmisores, creatina),                                       |
|    |                |           | FLJ43855         | miembro 8; transportador similar a la creatina dependiente de sodio y cloruro                                       |
|    | 2,19           | AU147799  | LRRC15           | repetición rica en leucina que contiene 15  |
| 65 | 2,18           | AW337166  | LOC255104        | Dominios transmembrana y de bobina en espiral 4   |
|    | 2,18           | NM_006505 | PVR              | receptor de poliovirus  |

(Continuación)

|    | Cambio de fold | Genbank   | Símbolo genético | Descripción   |
|----|----------------|-----------|------------------|---|
| 5  | 2,18           | AI638420  | CLIC4            | canal intracelular de cloruro 4   |
|    | 2,18           | AI167482  | SCUBE3           | Péptido señal, dominio CUB, similar a EGF 3   |
|    | 2,18           | AI739514  | HAS3             | hialuronano sintasa 3   |
|    | 2,18           | NM_005971 | FXYD3            | Dominio FXYP que contiene el regulador de transporte de iones 3   |
|    | 2,17           | AL022398  | TRAF3IP3         | TRAF3 que interactúa con la proteína 3  |
|    | 2,17           | U90940    | FCGR2C           | Fc fragmento de IgG, baja afinidad IIc, receptor para (CD32)  |
| 10 | 2,16           | BC023540  | SORCS1           | VPS10 relacionado con Sortilin que contiene el receptor 1   |
|    | 2,16           | AV713913  | OSTM1            | proteína transmembrana asociada a osteopetrosis 1   |
|    | 2,15           | NM_024505 | NOX5             | NADPH oxidasa, dominio de unión a calcio EF-mano 5  |
|    | 2,15           | BC006178  | SEC22L3          | Vesículas SEC22 que trafican con proteínas 3 (S. cerevisiae); SEC22 tráfico de vesículas similar a la proteína 3 (S. cerevisiae)  |
|    | 2,15           | BG151527  | GRIK5            | receptor de glutamato, ionotrópico, kainato 5   |
| 15 | 2,14           | AW001754  | NEGR1            | regulador de crecimiento neuronal 1   |
|    | 2,14           | NM_013979 | BNIP1            | BCL2/adenovirus E1B 19kDa que interactúa con la proteína 1  |
|    | 2,14           | NM_018643 | TREM1            | receptor desencadenante expresado en células mieloides 1  |
|    | 2,12           | NM_005284 | GPR6             | Receptor 6 acoplado a proteínas G   |
|    | 2,11           | AA454190  | ZDHHC20          | dedo de zinc, tipo DHHC que contiene 20   |
| 20 | 2,11           | AB048796  | TMPRSS13         | proteasa transmembrana, serina 13   |
|    | 2,11           | AL044520  | NYD-SP21         | NYD-SP21 relacionado con el desarrollo de los testículos  |
|    | 2,11           | BE463930  | TMAP1            | Remodelación matricial asociada 7   |
|    | 2,10           | NM_152264 | SLC39A13         | portador de solutos familia 39 (transportador de zinc), miembro 13  |
|    | 2,08           | AL530874  | EPHB2            | Receptor de EPH B2  |
|    | 2,07           | NM_018668 | VPS33B           | proteína vacuolar que clasifica 33B (levadura)  |
| 25 | 2,07           | NM_024531 | GPR172A          | Receptor 172A acoplado a proteínas G  |
|    | 2,07           | NM_023038 | ADAM19           | dominio de ADAM metalopeptidasa 19 (meltrin beta)   |
|    | 2,07           | BC001281  | TNFRSF10B        | superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10b  |
|    | 2,07           | AF217749  | PCDHB9           | protocadherina beta 9   |
|    | 2,06           | AB030077  | FGFR2            | receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (quinasa expresada en bacterias, receptor del factor de crecimiento de queratinocitos, disostosis craneofacial 1, Síndrome de Crouzon, síndrome de Pfeiffer, Jackson-Weiss síndrome) |
| 30 | 2,06           | AL137432  | SUSD1            | dominio de sushi que contiene 1   |
|    | 2,05           | NM_004518 | KCNQ2            | canal dependiente de voltaje de potasio, subfamilia similar a KQT, miembro 2  |
|    | 2,04           | AI672363  | VPS33B           | proteína vacuolar que clasifica 33B (levadura)  |
| 35 | 2,04           | NM_006671 | SLC1A7           | portador de solutos familia 1 (transportador de glutamato), miembro 7   |
|    | 2,03           | AA215519  | DLGAP1           | Discos, proteína grande (Drosophila) asociada al homólogo 1   |
|    | 2,02           | NM_004648 | PTPNS1           | proteína tirosina fosfatasa, sustrato de tipo no receptor 1   |
|    | 2,02           | NM_002564 | P2RY2            | receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 2  |
|    | 2,01           | BF511678  | SCUBE3           | Péptido señal, dominio CUB, similar a EGF 3   |
| 40 | 2,01           | BC013385  | CLEC7A           | Familia de dominio de lectina de tipo C 7, miembro A  |

**[0134]** *CD47 facilita el injerto, inhibe la fagocitosis y se expresa más altamente en CML de LMA.* Desde hace tiempo se reconoce que el sistema inmune innato, a través de las células efectoras asesinas naturales (NK), funciona en la eliminación de células no propias y aberrantes. Las células NK eliminan las células diana reconocidas por una variedad de receptores activadores de células NK que se unen a los ligandos presentes en muchas células normales; sin embargo, la expresión de moléculas de clase I del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) puede proteger una célula uniéndose a receptores inhibidores de NK.

**[0135]** Estos receptores inhibidores a menudo contienen motivos inhibidores de inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM) que reclutan y activan las tirosina fosfatasa SHP-1 y SHP-2, que a su vez inhiben la transducción de señales de los receptores activadores. La evidencia acumulada indica que las células efectoras derivadas de monocitos, como los macrófagos y las células dendríticas, también están involucradas en la eliminación de células no propias y aberrantes, mediadas por varios receptores activadores. Estas células efectoras también expresan el receptor inhibidor, la proteína alfa reguladora de señal (SIRP $\alpha$ ), que contiene un motivo ITIM capaz de reclutar y activar las fosfatasa SHP-1 y SHP-2, lo que resulta en la inhibición de la fagocitosis. Varios estudios han identificado CD47 como el ligando para SIRP $\alpha$ . CD47 es una proteína transmembrana ampliamente expresada, originalmente identificada como proteína asociada a integrina (IAP) debido a su asociación física con varias integrinas.

**[0136]** CD47 se ha implicado en una serie de procesos que incluyen activación de plaquetas, motilidad y adhesión celular, y adhesión, migración y fagocitosis de leucocitos. La interacción CD47-SIRP $\alpha$  se ha implicado en la inhibición de la fagocitosis de una serie de estudios. Primero, los macrófagos esplénicos eliminaron rápidamente del torrente sanguíneo los glóbulos rojos de ratón (RBC) deficientes en CD47, pero no de tipo salvaje, cuando se transfundieron en ratones de tipo salvaje, y este efecto dependía de la interacción  $\alpha$  de CD47-SIRP. Los linfocitos y las células de la médula ósea deficientes en CD47, pero no de tipo salvaje, también se eliminaron rápidamente tras el trasplante en receptores congénitos de tipo salvaje a través de macrófagos y fagocitosis mediada por células dendríticas. Evidencia adicional sugiere que la interacción CD47-SIRP $\alpha$  puede inhibir la fagocitosis estimulada por el reconocimiento de IgG

o complementar las células osonizadas. Por lo tanto, CD47 funciona como un regulador crítico de la fagocitosis de macrófagos y células dendríticas al unirse a SIRP $\alpha$  y entregar una señal inhibitoria dominante.

5 **[0137]** Se determinó la expresión de CD47 en humanos CML de LMA y HSC normales por citometría de flujo. HSC (LinCD34+CD38-CD90+) de tres muestras de sangre periférica movilizada humana normal y CML de LMA (Lin-CD34+CD38-CD90-) de siete muestras de LMA humana se analizaron para determinar la expresión superficial de CD47 (Figura 2). CD47 se expresó a bajos niveles en la superficie de HSC normal; sin embargo, en promedio, fue aproximadamente 5 veces más altamente expresado en CML de LMA, así como en blastos leucémicos a granel.

10 **[0138]** *Anticuerpo Monoclonal CD47 anti-humano estimula la fagocitosis e inhibe el injerto de CML de LMA.* Con el fin de probar el modelo que sobreexpresión de CD47 en CML de LMA impide la fagocitosis de estas células a través de su interacción con SIRP $\alpha$  en células efectoras, hemos utilizado un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 conocido para interrumpir la interacción de CD47-SIRP $\alpha$ . El hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal CD47 de ratón antihumano, denominado B6H12, se obtuvo de ATCC y se usó para producir anticuerpo purificado. Primero, realizamos ensayos de fagocitosis *in vitro*. Los CML de LMA humana primaria se purificaron mediante FACS de dos muestras de LMA humana, y luego se cargaron con el colorante fluorescente CFSE. Estas células se incubaron con macrófagos derivados de médula ósea de ratón y se monitorizaron usando microscopía de inmunofluorescencia (Figura 2) y citometría de flujo (Figura 3) para identificar células fagocitadas. En ambos casos, no se observó fagocitosis en presencia de un anticuerpo de control de isotipo; sin embargo, se detectó una fagocitosis significativa con la adición del anticuerpo anti-CD47. Por lo tanto, el bloqueo de CD47 humano con un anticuerpo monoclonal es capaz de estimular la fagocitosis de estas células por los macrófagos de ratón.

25 **[0139]** A continuación, se investigó la capacidad del anticuerpo anti-CD47 para inhibir injerto de CML de LMA *in vivo*. Dos muestras de LMA humanas primarias no se trataron o se recubrieron con el anticuerpo anti-CD47 antes del trasplante en ratones recién nacidos NOG. 13 semanas después, los ratones se sacrificaron y se analizaron para detectar injerto de médula ósea en leucemia humana mediante citometría de flujo (Figura 5). Los ratones de control demostraron injerto leucémico mientras que los ratones trasplantados con las células recubiertas con anti-CD47 mostraron poco o ningún injerto. Estos datos indican que el bloqueo de CD47 humano con un anticuerpo monoclonal puede inhibir el injerto de CML de LMA.

30 **[0140]** *CD96 es una molécula de superficie celular específica de células madre de leucemia mieloide aguda humana.* El CD96, originalmente denominado Táctil, se identificó por primera vez como una molécula de la superficie de las células T que está altamente regulada por activación de las células T. CD96 se expresa a niveles bajos en las células T y NK en reposo y está fuertemente regulado por estimulación en ambos tipos de células. No se expresa en otras células hematopoyéticas, y el examen de su patrón de expresión mostró que solo está presente en algunos epitelios intestinales. El dominio citoplasmático de CD96 contiene un supuesto motivo ITIM, pero no se sabe si esto funciona en la transducción de señales. CD96 promueve la adhesión de las células NK a las células diana que expresan CD155, lo que resulta en la estimulación de la citotoxicidad de las células NK activadas.

40 **[0141]** *Expresión preferencial de la superficie celular de moléculas identificadas a partir del análisis de expresión génica.* Más allá de CD47 y CD96, se sabe que varias de las moléculas enumeradas en la Figura 2B se expresan en CML de LMA, incluyendo: CD123, CD44 y CD33. Las moléculas restantes no se han informado o identificado previamente como expresadas preferentemente en CML de LMA humana en comparación con sus equivalentes normales. Hemos examinado la expresión de la superficie celular de dos de estas moléculas mediante citometría de flujo para determinar si existe una expresión preferencial en CML de LMA en comparación con HSC normal.

50 **[0142]** Con el fin de evaluar los otros genes candidatos en la Figura 1B, seleccionamos en esta lista aquellas moléculas que probablemente no se expresarían en HSC normal en función de los valores de expresión de matriz cruda. Luego, utilizando informes publicados, investigamos el patrón de expresión de estos genes para identificar aquellos con patrones de expresión muy restringidos para los cuales los anticuerpos monoclonales tendrían pocos objetivos además de las células leucémicas. Sobre la base de estos métodos, se identificaron dos genes prometedoros: el receptor 2 de la hormona paratiroidea y el receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (también conocido como TIM-3: mucina 3 de inmunoglobulina de células T). El receptor 2 de la hormona paratiroidea (PTHr2) se expresa normalmente en el páncreas y en algunas áreas del sistema nervioso central. Su ligando primario es un péptido denominado péptido tuberoinfundibular 39 (TIP39). El receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (HAVCR2) se expresa normalmente en un subconjunto de linfocitos T. Su ligando primario es una molécula llamada Galectin-9.

60 **[0143]** La validación de secuencias adicionales utiliza anticuerpos específicos y prueba por citometría de flujo, en comparación con células progenitoras multipotentes normales.

Ejemplo 2

65 **[0144]** CD99 es una glicoproteína de superficie con la máxima expresión en células T donde puede funcionar en la adhesión celular. La expresión de CD99 en HSC (Lin-CD34+CD38-CD90+) de tres muestras de sangre de cordón umbilical humana normal y CML de LMA (Lin-CD34+CD38-CD90-) de siete muestras de LMA humana se determinó por citometría de flujo (Figura 6). CD99 se expresó a bajos niveles en la superficie de HSC normal; sin embargo, en

promedio, es aproximadamente 5 veces más altamente expresado en CML de LMA. CD97 se expresa normalmente en la mayoría de las células hematopoyéticas maduras y se regula por aumento en los linfocitos activados donde puede funcionar en la migración celular y la adhesión. El perfil de expresión génica indica una expresión baja a ausente de CD97 en HSC y MPP, con una expresión aproximadamente 10 veces mayor en CML de LMA. La expresión de CD97 en HSC de sangre de cordón normal y CML de LMA se examinó mediante citometría de flujo y se encontró que estaba ausente en HSC y alta en 5 de las 7 muestras de CML de LMA (Figura 7).

**[0145]** Examinamos la expresión superficial de CD97, CD99, CD180 y TIM3 (HAVCR2) en varias muestras de HSC (tanto de médula ósea normal como de sangre de cordón) y múltiples muestras de LMA humana de novo, usando citometría de flujo. Encontramos una mayor expresión de cada una de estas moléculas en CML de LMA con una expresión baja o ausente en HSC (Figuras 8-10). También investigamos la expresión de PTH2R en HSC y CML de LMA de médula ósea utilizando PCR cuantitativa en tiempo real, ya que no hay anticuerpos monoclonales validados para citometría de flujo disponibles para este antígeno. No encontramos expresión de PTHR2 en HSC con aumento de expresión en CML de LMA.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

**REIVINDICACIONES**

- 5     **1.** Un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 humano que bloquea la interacción del CD47 humano con SIRP $\alpha$ , para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) humana estimulando la fagocitosis de las células madre leucémicas (CML) de la LMA por los macrófagos, donde el anticuerpo dirigido contra CD47 humano se usa en combinación con uno o más anticuerpos monoclonales adicionales dirigidos contra uno o más de los siguientes marcadores: CD96, CD97, CD99, CD180, PTHR2, HAVCR2, CD123, CD44 y CD33.
- 10    **2.** El anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 humano para el uso de la reivindicación 1, en donde los anticuerpos monoclonales son anticuerpos humanos o humanizados.

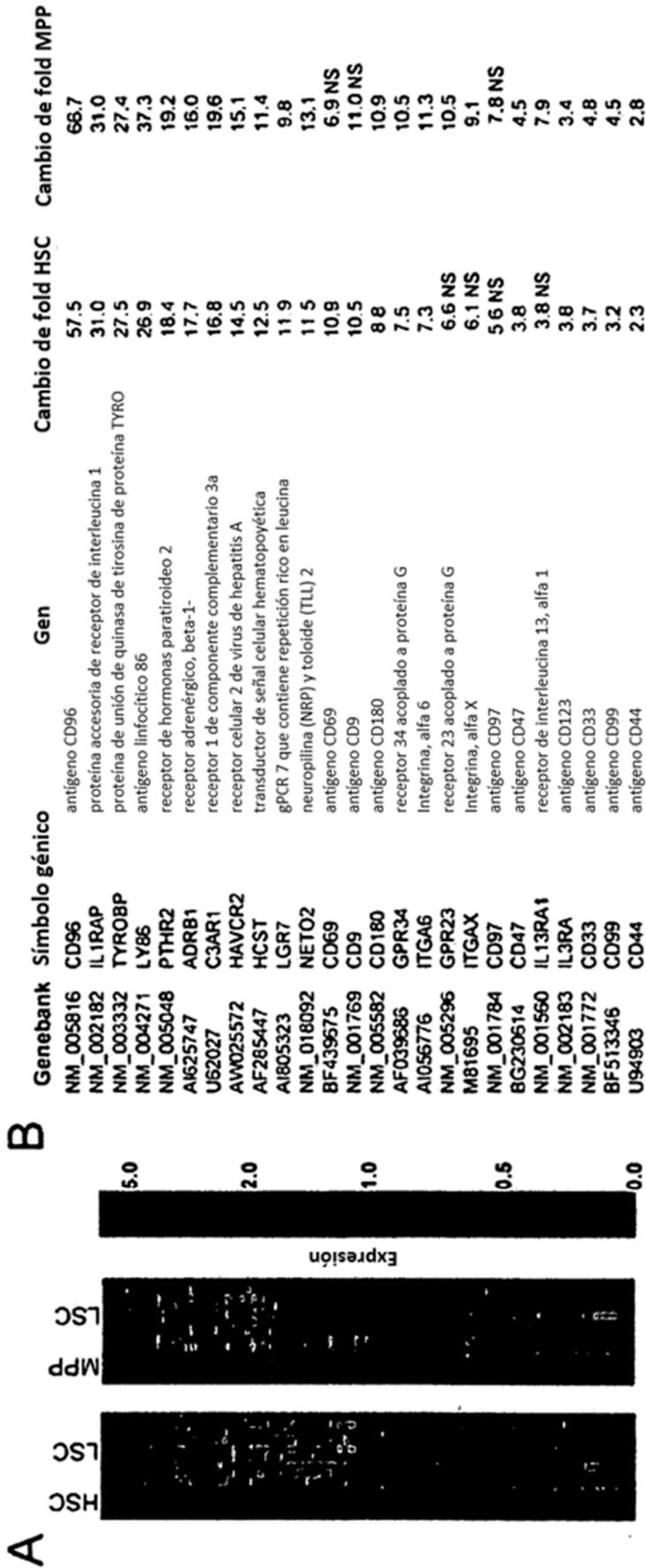


FIGURA 1

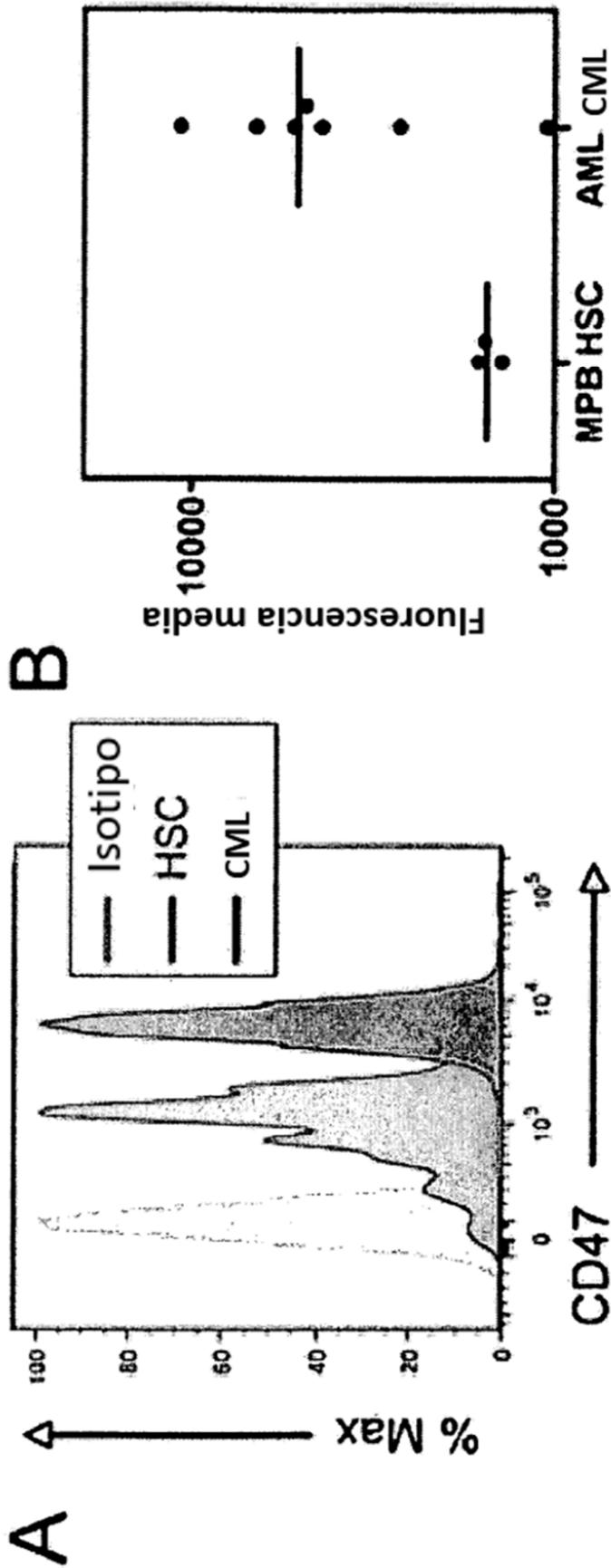


FIGURA 2



FIGURA 3

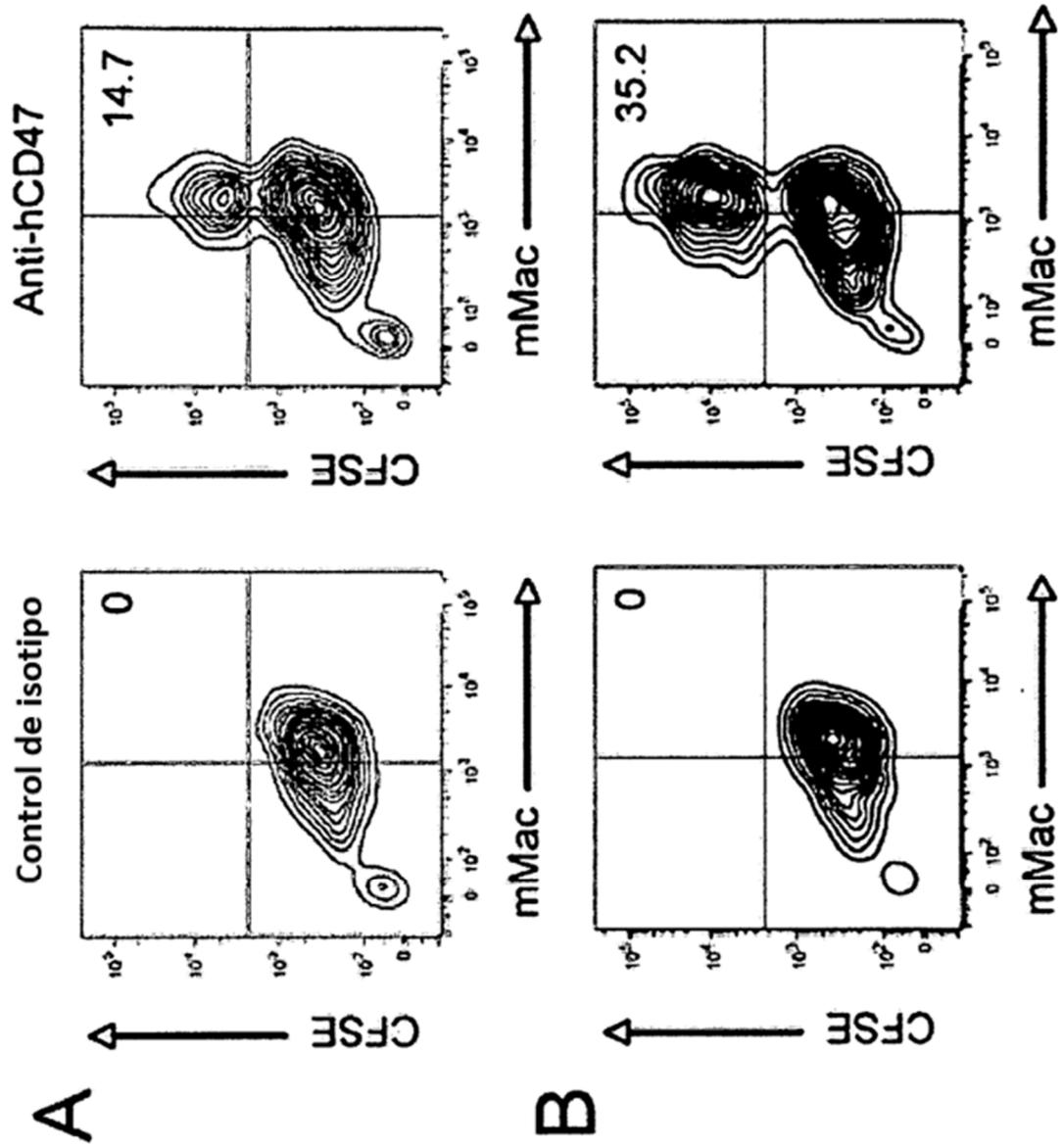


FIGURA 4

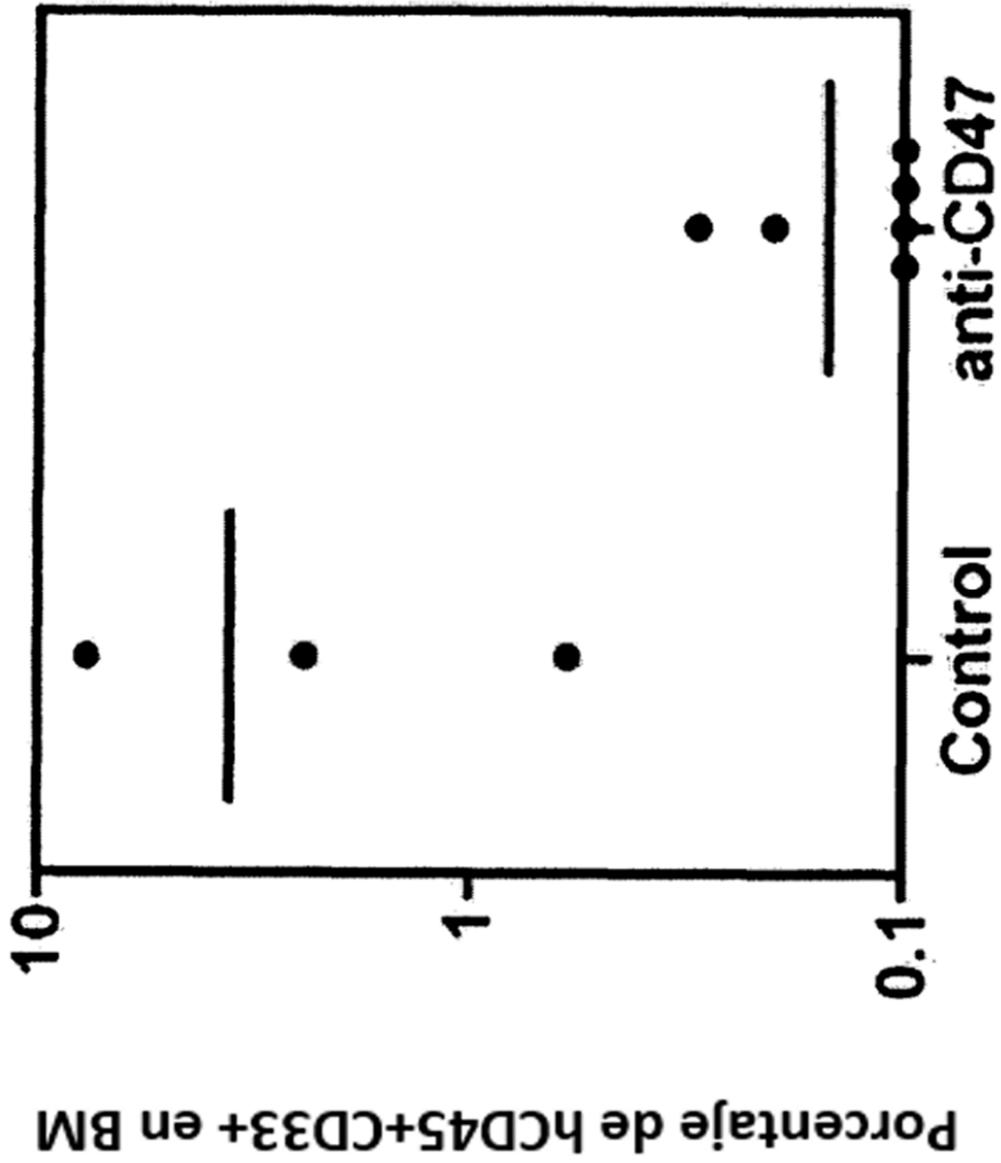
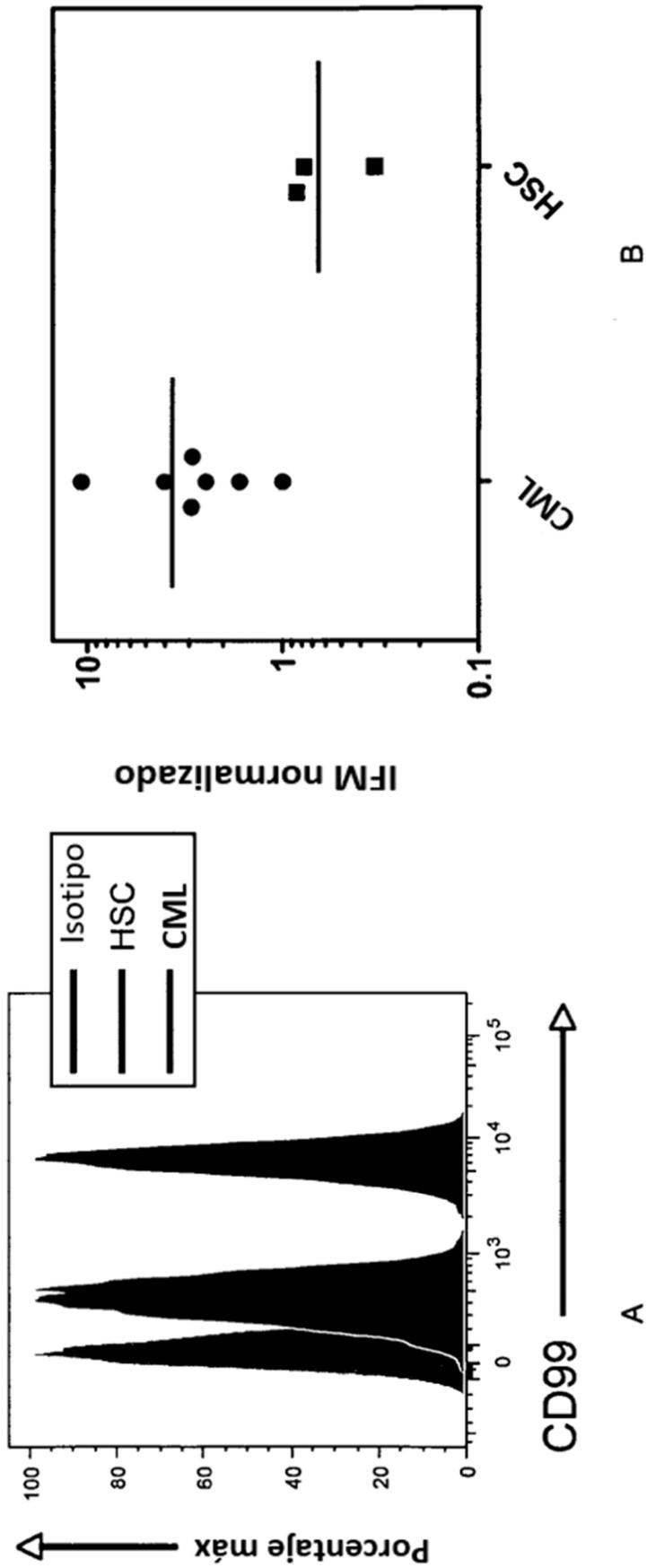
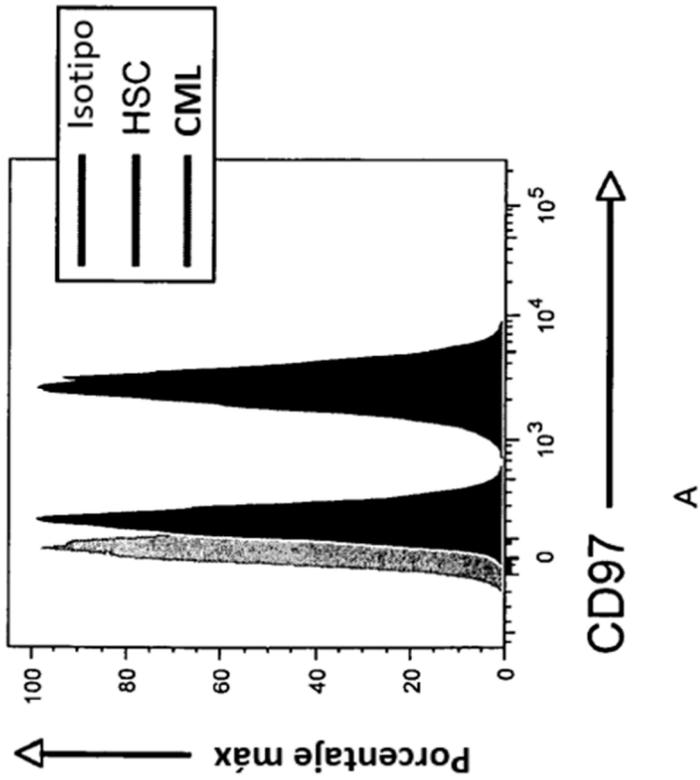


FIGURA 5

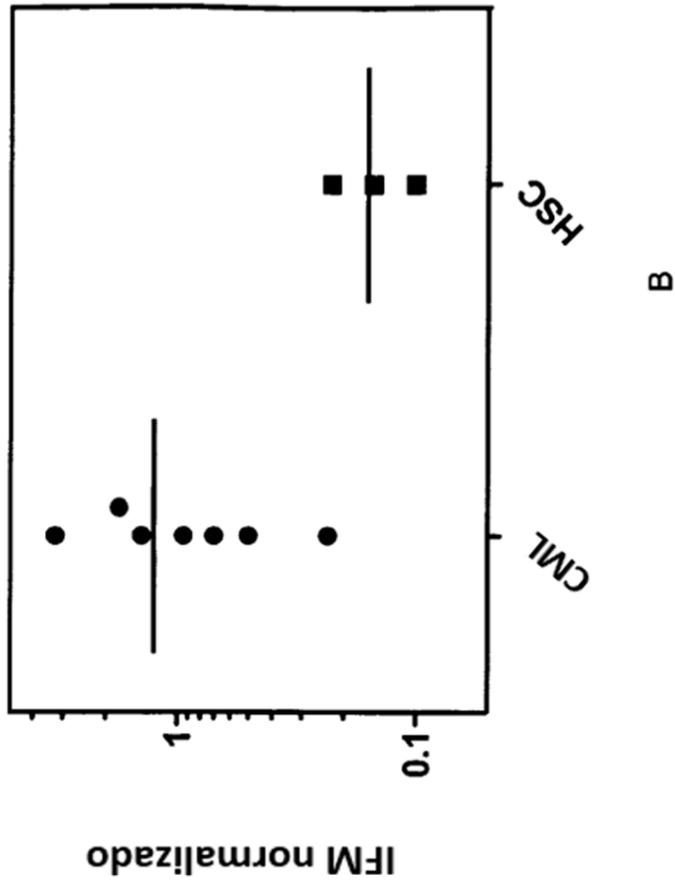
FIGURA 6





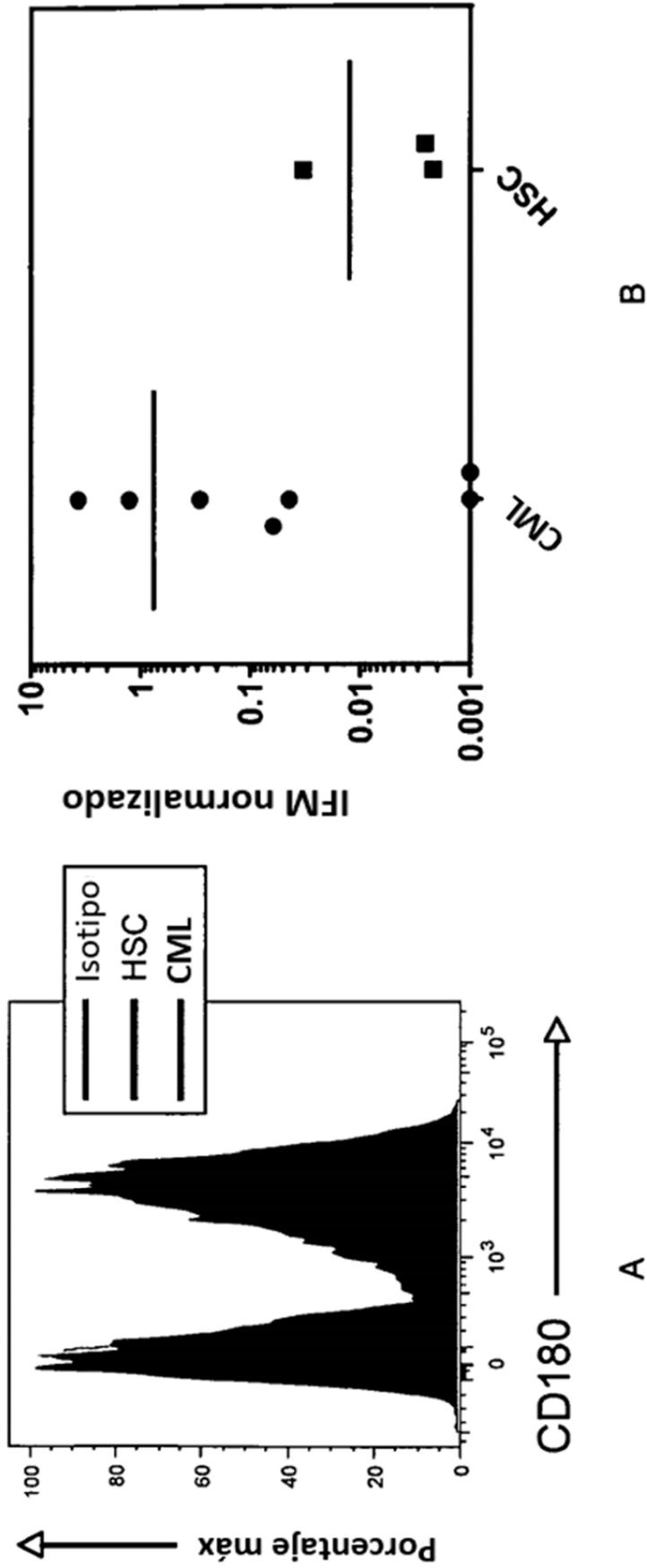
A

FIGURA 7



B

FIGURA 8



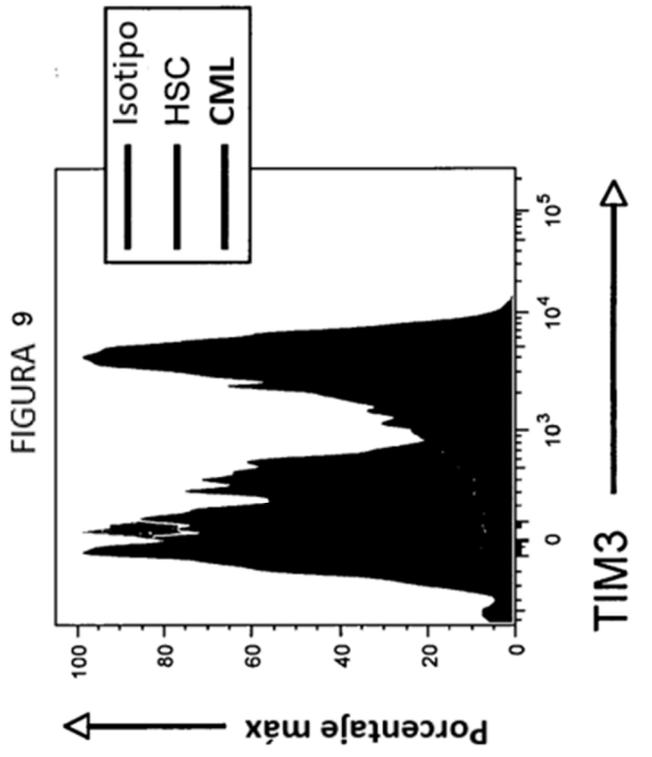


FIGURA 10

