

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 553**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01) **G01N 33/50** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/42 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2009** **E 16164792 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 3118326**

54 Título: **Marcador molecular para células madre cancerosas**

30 Prioridad:

27.10.2008 JP 2008275539
19.03.2009 JP 2009068656

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2021

73 Titular/es:

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)
291, Minami 1-jo Nishi 17-chome Chuo-ku
Sapporo-shi
Hokkaido 060-0061, JP y
SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.
(50.0%)

72 Inventor/es:

TORIGOE, TOSHIHIKO;
HIROHASHI, YOSHIHIKO;
SATOH, NORIYUKI;
KAMIGUCHI, KENJIRO;
MORITA, RENA;
NISHIZAWA, SATOSHI y
TAKAYA, AKARI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 805 553 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

Marcador molecular para células madre cancerosas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un marcador molecular para detectar células madre cancerosas en una población celular como una diana de detección, detectándose el marcador molecular en células madre cancerosas contenidas en la diana de detección, pero no detectándose en células normales o en células cancerosas diferentes de células madre cancerosas.

Técnica anterior

Se cree que las células madre cancerosas son la causa principal de recidiva o metástasis del cáncer, y se ha señalado la importancia de abordar las células madre cancerosas en terapia contra el cáncer. Sin embargo, la proporción de células madre cancerosas en tejido tumoral es muy baja (documento no de patente 4), y es muy difícil reconocer específicamente y tratar las células madre cancerosas. El desarrollo de técnicas para detectar las células madre cancerosas y nuevas terapias que aborden las células madre cancerosas son cuestiones importantes en los cuidados contra el cáncer.

Actualmente, se conocen marcadores moleculares tales como CD133, CD24, y CD44 como marcador de células madre cancerosas (documentos no de patente 1 a 7), pero se dice que son eficaces solamente en unas pocas clases de células cancerosas y es necesario identificar nuevos marcadores moleculares para detectar células madre cancerosas en una mayor diversidad de cánceres.

Documentos de la técnica anterior

- [Documento no de patente 1] Shu Zhang *et al.*, Cancer Res. 68: (11) 4311-4320, 2008
- [Documento no de patente 2] Shih-Hwa Chiou *et al.*, Clin. Cancer Res. 14(13) 4085-4095, 2008
- [Documento no de patente 3] Gang-Ming Zou, J. Cell. Physiol. 217: 598-604, 2008
- [Documento no de patente 4] Cheong J. Lee *et al.*, J Clin Oncol 26: 2806-2812, 2008
- [Documento no de patente 5] Madhuri Kakarala *et al.*, J Clin Oncol 26: 2813-2820, 2008
- [Documento no de patente 6] Craig D. Peacock *et al.*, J Clin Oncol 26: 2883-2889, 2008
- [Documento no de patente 7] Xing Fan *et al.*, J Clin Oncol 26: 2821-2827, 2008

Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un marcador molecular útil para detectar células madre cancerosas.

Medio para resolver los problemas

Aunque los presentes inventores han estado realizando una investigación intensiva para resolver los problemas mencionados anteriormente, han apreciado un nuevo hallazgo de que, con respecto a al menos un tejido, preferiblemente una pluralidad de tejidos en términos de mayor utilidad, es indispensable que no se exprese un gen marcador de células madre cancerosas en células normales derivadas del tejido pero que se exprese en células madre cancerosas; es decir, que se exprese poco en tejidos normales en una muestra, ya que la muestra para identificar un gen de células madre cancerosas habitualmente contiene tejido normal. También se ha descubierto que casi todos los genes marcadores de células madre cancerosas, presentados hasta ahora, se expresan en tejido normal a un alto nivel, y como resultado de investigaciones adicionales por los presentes inventores se ha descubierto que el gen de la región de determinación del sexo Y-box2 (Sox2), que se conoce como un factor de transcripción, no se expresa en células normales adultas, pero se expresa inesperadamente en células madre cancerosas. Como resultado de investigaciones adicionales, se ha descubierto que otros genes, incluyendo el gen de la proteína rica en cisteína asociada con mitocondrias de esperma (Smcp), se expresa poco en células normales adultas, pero se expresa en células madre cancerosas, y la presente invención por tanto se ha conseguido.

Es decir, la presente invención comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en DNAJB8(143-151); AFMEAFSSF (SEQ ID NO: 71), DNAJB8(22-30): AYRKLALRW (SEQ ID NO: 68), y DNAJB8(99-107): IFREFFGGL (SEQ ID NO: 70).

Además, la presente invención comprende un ácido nucleico que codifica DNAJB8 para su uso en el tratamiento del cáncer.

Además, la presente invención comprende un producto de expresión de un gen de DNAJB8 para su uso en la detección de células madre de cáncer *in vivo*.

Además, la presente invención comprende un método *in vitro* para la detección de células madre del cáncer en una diana de detección detectando la presencia de un producto de expresión de DNAJB8, en donde la diana de detección es una o más poblaciones de células que provienen de una célula o tejido seleccionados del grupo que consiste en células del corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovario, intestino delgado, leucocitos, colon, estómago, médula ósea, intestino grueso y células mononucleares de sangre periférica.

Además, la presente invención comprende el uso de un kit que comprende un reactivo para la detección de al menos el producto de expresión de un gen de DNAJB8 en la determinación de la presencia o ausencia de células madre de cáncer *in vitro*.

La presente divulgación se refiere a un marcador molecular para detectar células madre cancerosas en una población celular como diana de detección, donde el marcador molecular se detecta en células madre cancerosas contenidas en la diana de detección, pero no se detecta en células madre o células cancerosas diferentes a células madre cancerosas.

Además, la presente divulgación se refiere al marcador molecular, donde la diana de detección es una o más poblaciones de células derivadas de células o tejido seleccionadas del grupo que consiste en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, leucocitos, colon, estómago, médula ósea, intestino grueso, y células mononucleares de sangre periférica.

Además, la presente divulgación se refiere al marcador molecular, donde no se detecta en células normales o células cancerosas diferentes a células madre cancerosas para todas las dianas de detección.

Además, la presente divulgación se refiere al marcador molecular, donde el marcador molecular es un producto de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Or7c1, Dnajb8, Sox2, Smcp, Ints1, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, y Scgb3a1.

Además, la presente divulgación se refiere a un método para determinar la presencia o ausencia de células madre cancerosas en una diana de determinación usando el marcador molecular como indicador.

Además, la presente divulgación se refiere al método, donde la población celular contiene células normales y/o células cancerosas diferentes a células madre cancerosas.

Además, la presente divulgación se refiere al método, donde la población celular se obtiene de una o más células o tejidos seleccionados del grupo que consiste en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, leucocitos, colon, estómago, médula ósea, intestino grueso, y células mononucleares de sangre periférica.

Además, la presente divulgación se refiere al método, donde se determina que las células madre cancerosas están presentes cuando se detecta un producto de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Or7c1 Dnajb8, Sox2, Smcp, Ints1 Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, y Scgb3a1.

Además, la presente divulgación se refiere al método, donde el producto de expresión del gen es ARNm y/o polipéptido endógeno.

Además, la presente divulgación se refiere al método, donde el producto de expresión del gen es ARNm, y el método comprende detectar ARNm por un método de RT-PCR.

Además, la presente divulgación se refiere al método, donde el producto de expresión del gen es polipéptido endógeno, y el método comprende detectar polipéptido endógeno mediante un reactivo que reaccione específicamente con el mismo.

Además, la presente divulgación se refiere al método donde el reactivo es un anticuerpo.

Además, la presente divulgación se refiere al método, donde la determinación se realiza *in vitro* o *in vivo*.

Además, la presente divulgación se refiere a un método para detectar un agente terapéutico contra el cáncer donde el método incluye

- i) una etapa de medición de una cantidad detectada "A" del marcador molecular antes de administrar un compuesto candidato a una población celular,
- ii) una etapa de administración de un compuesto candidato a la población celular,
- iii) una etapa de medición de una cantidad detectada "B" del marcador molecular medido en i) después de administrar el compuesto candidato a la población celular, y

iv) una etapa de determinación de que un compuesto candidato es un candidato para un agente terapéutico contra el cáncer cuando A es significativamente más grande en comparación con B.

Además, la presente divulgación se refiere a un kit para determinar la presencia o ausencia de células madre cancerosas, donde el kit incluye un reactivo para detectar el marcador molecular.

Además, la presente divulgación se refiere al kit, donde el reactivo para la detección es una sonda y/o un cebador para detectar ARNm que es un producto de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Or7c1, Dnajb8, Sox2, Smcp, Ints1, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, y Scgb3a1, donde la sonda y/o cebador comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al gen.

Además, la presente divulgación se refiere al kit, donde el reactivo para la detección es un anticuerpo para detectar un polipéptido que es un producto de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Or7c1, Dnajb8, Sox2, Smcp, Ints1, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, y Scgb3a1.

Además, la presente divulgación se refiere a un método para determinar un cáncer empleando el kit.

Además, la presente divulgación se refiere a un polipéptido que puede usarse como antígeno para inhibir la función de células madre cancerosas o eliminar células madre cancerosas, donde el polipéptido es un polipéptido codificado por Or7c1, Dnajb8, Sox2, Smcp, Ints1, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, o Scgb3a1, o una parte de los mismos, o un polipéptido en que uno o varios aminoácidos en el polipéptido o una parte del mismo están delecionados, sustituidos o añadidos.

Además, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo que reacciona específicamente con un epítipo derivado de un producto de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Or7c1, Dnajb8, Sox2, Smcp, Ints1, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, y Scgb3a1.

Además, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos uno del polipéptido y/o el anticuerpo.

Además, la presente divulgación se refiere a la composición farmacéutica, donde la composición farmacéutica se usa para tratar o prevenir el cáncer.

Además, la presente divulgación se refiere a un método para inhibir la función de células madre cancerosas o eliminar células madre cancerosas usando el polipéptido como antígeno.

Además, la presente divulgación se refiere al método, donde el método emplea el anticuerpo.

Además, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica el polipéptido.

Además, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico.

Además, la presente divulgación se refiere a la composición farmacéutica, donde la composición farmacéutica es para una vacuna de ADN o ARN.

Además, la presente divulgación se refiere a un método para detectar un péptido que se presenta en un complejo principal de histocompatibilidad como antígeno, donde el método incluye

- i) una etapa de preparación de un péptido que tiene una longitud apropiada en que está fragmentado un polipéptido diana,
- ii) una etapa de cultivo en conjunto del péptido fragmentado obtenido en i), células presentadoras de antígeno, y células T sensibilizadas contra el polipéptido diana y/o el péptido fragmentado obtenido en i),
- iii) una etapa de medición del nivel de activación de las células T obtenidas en ii), y
- iv) una etapa de selección de un péptido fragmentado que tiene células T activadas en iii),

y el polipéptido diana es el polipéptido anterior.

Además, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico usado para suprimir la expresión de un gen en células madre cancerosas seleccionado del grupo que consiste en Or7c1, Dnajb8, Sox2, Smcp, Ints1, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, y Scgb3a1.

Además, la presente divulgación se refiere al ácido nucleico, donde el ácido nucleico es ADN y/o ARN.

Además, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos uno del ácido nucleico.

5 Además, la presente divulgación se refiere a la composición farmacéutica, donde la composición farmacéutica es para tratar el cáncer.

Además, la presente divulgación se refiere a un método para inhibir la función de células madre cancerosas usando el ácido nucleico.

10 Efectos de la invención

El marcador molecular proporcionado por la presente invención puede discriminar entre células madre cancerosas contenidas en células cancerosas y células cancerosas diferentes a células madre cancerosas. Además, como la discriminación puede realizarse por detección de un único marcador molecular, las células madre cancerosas pueden discriminarse muy fácilmente.

Además, como el marcador molecular de la presente invención puede usarse en común para una pluralidad de células madre cancerosas tales como células cancerosas pulmonares, células cancerosas de mama, y células cancerosas colorrectales, es muy eficaz como marcador molecular versátil para células madre cancerosas.

Además, como el marcador molecular de la presente invención no se detecta en absoluto o se detecta poco en células normales, es útil para la discriminación de células madre cancerosas y, además, para la discriminación de tejido tumoral que contiene células madre cancerosas.

Además, el marcador molecular de la presente invención tiene alta relevancia para la tumorigenicidad y es útil en inmunoterapia de células madre cancerosas, terapia dirigida molecular o terapia de transferencia génica dirigida a ese sitio, así como la detección de fármacos, péptido, etc. que pueden usarse en terapia contra el cáncer.

30 Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1] La FIG. 1 es un diagrama que muestra el resultado de análisis SP de líneas celulares de cáncer pulmonar. Las partes rodeadas por una línea corresponden a las fracciones SP respectivas, y % indica la proporción de células de la fracción SP en las células totales.

35 [FIG. 2] La FIG. 2 es un diagrama que muestra el resultado de un experimento de tumorigenicidad en ratones NOD/SCID. a) es una fotografía de un ratón 8 semanas después del implante. b) muestra gráficos del valor promedio del tamaño del tumor cada semana para los grupos a los que se ha implantado 1500 células de LHK2 (células de cáncer pulmonar), MCF7 (células de cáncer de mama), y SW480 (células de cáncer colorrectal).

40 [FIG. 3] La FIG. 3 es un diagrama que muestra la expresión de Sox2 en a) células normales adultas humanas y b) en la fracción SP y la fracción MP de líneas celulares cancerosas.

[FIG. 4] La FIG. 4 es un diagrama que muestra la expresión de Smcp y FLJ13464 en a) células normales adultas humanas y b) en la fracción SP y la fracción MP de líneas celulares cancerosas.

45 [FIG. 5] La FIG. 5 es un diagrama que muestra un gráfico de expresión en cada una de las células para los genes que se examinaron. En el diagrama, cuando no se observaba expresión se da como negativo, cuando se observaba expresión se da como positivo, y cuando, aunque había muy ligera expresión, era una cantidad traza de expresión que no podía decirse que fuera expresión significativa se da como falso positivo. Los que son falsos positivos se determinan como "no detectados". En el diagrama, LHK2 es cáncer pulmonar, MFH03 es sarcoma de tejido blando, MCF7 es cáncer de mama, LHK2-SOX2 es la línea celular LHK2 con el gen SOX2 sobreexpresado, y SW480 y KM12 son líneas celulares de cáncer colorrectal.

50 [FIG. 6] La FIG. 6 es un diagrama que muestra la expresión de Sox2 en otras líneas celulares cancerosas.

[FIG. 7] La FIG. 7 es un diagrama que muestra la expresión de Smcp en otras líneas celulares cancerosas. Muestra los resultados cuando se realizó investigación estableciendo los ciclos de PCR a 35 ciclos y 40 ciclos respectivamente. En el diagrama, Caki-1, ACHN, y SMKTR-1 a -4 son líneas celulares de cáncer de células renales, Sq1 es una línea celular de cáncer pulmonar de células escamosas, 1-87, A549, y LHK2 son líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar, LC817 es una línea celular de cáncer pulmonar microcítico, 86-2 y Lu99 son líneas celulares de cáncer pulmonar no microcítico, HPC3 es una línea celular de cáncer pancreático, y LCC (ratón) son células de cáncer pulmonar de ratón.

60 [FIG. 8] La FIG. 8 a) es un diagrama que muestra la expresión de Ints1 en células normales y en la fracción SP y la fracción MP de líneas celulares cancerosas SW480, KM12, LHK2, y MCF7. b) es un diagrama que muestra la expresión de Ints1 en líneas celulares cancerosas. En el diagrama, las líneas celulares cancerosas son las mismas que en la FIG. 6 Y FIG. 7.

[FIG. 9] La FIG. 9 es un diagrama que muestra el resultado de tinción inmunohistoquímica en tejido de cáncer pulmonar. El Caso 1 y Caso 2 son imágenes de tejido de cáncer pulmonar escamoso teñido obtenido de diferentes pacientes con cáncer. Una parte azul indica un núcleo teñido por tinción con hematoxilina, y una parte marrón indica proteína antigénica SOX2 teñida por anticuerpo anti-SOX2.

[FIG. 10] La FIG. 10 es un diagrama que muestra los resultados de tinción inmunohistoquímica en tejido de

cáncer de mama. El Caso 1 muestra imágenes de tinción del patrón citoplasmático, el Caso 2 muestra imágenes de tinción del patrón nuclear, CK5 muestra imágenes teñidas por anticuerpo anti-CK5, y SOX2 muestra imágenes teñidas por anticuerpo anti-SOX2. Una parte azul indica un núcleo teñido por tinción con hematoxilina, y una parte marrón indica proteína antigénica teñida por anticuerpo anti-CK5 o anticuerpo anti-SOX2.

[FIG. 11] La FIG. 11 es un diagrama que muestra los resultados de tinción inmunohistoquímica en a) cerebro, b) pulmón, c) páncreas, y d) estómago. Una parte azul indica un núcleo teñido por tinción con hematoxilina, y una parte marrón indica proteína antigénica SOX2 teñida por anticuerpo anti-SOX2. Una parte mostrada por flecha negra indica células ligeramente teñidas por anticuerpo contra SOX2.

[FIG. 12] La FIG. 12 es un gráfico que muestra un cambio en la capacidad tumorigénica por expresión forzada de SOX2. La fotografía a la izquierda es una fotografía de un ratón 9 semanas después del implante del tumor. El gráfico a la derecha es un gráfico del valor promedio para el tamaño del tumor en 9 semanas de un grupo al que se han implantado 10000 células. En el gráfico, los cuadrados negros indican células LHK2 en que se expresó de forma forzada SOX2, y los rombos negros indican células LHK2 transfectadas de forma simulada.

[FIG. 13] La FIG. 13 es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia del paciente para pacientes con cáncer de mama SOX2 positivo y pacientes con cáncer de mama SOX2 negativo.

[FIG. 14] La FIG. 14 a) da los resultados de investigación del nivel de expresión del gen SOX2 por un método de RT-PCR en células transfectadas con el gen sh-SOX2 y células transfectadas con sh-EGFP. b) es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia celular a cada concentración de cisplatino cuando se cultivaban células respectivas en un medio que contenía cisplatino durante 24 horas.

[FIG. 15] La FIG. 15 es un diagrama que muestra el resultado de un ensayo de unión a HLA-A24 de péptido derivado del polipéptido SOX2. Se identifica un péptido que mostraba un MFI al mismo nivel o cercano al de un péptido usado como control positivo como un péptido de unión a HLA-A24.

[FIG. 16] La FIG. 16 es un diagrama que muestra el resultado de un ensayo de citotoxicidad de péptido SOX2_109. Se detectó un nivel extremadamente alto respecto al péptido derivado de VIH, que era un control negativo.

[FIG. 17] La FIG. 17 es un diagrama que muestra el resultado de un ensayo ELISPOT del péptido SOX2_109. No se detectó liberación de IFN γ para el péptido derivado de VIH como control negativo, pero se detectó liberación de IFN γ para el péptido SOX2_109.

[FIG. 18] La FIG. 18 a) es un diagrama esquemático de un plásmido usado para la transferencia del gen SMCP y un diagrama esquemático de un ratón con implante, y b) es una fotografía de un ratón 5 semanas después de que se implantaran células LHK2 transfectadas con el gen de expresión SMCP y células LHK2 transfectadas de forma simulada. c) es un gráfico del tamaño del tumor medido cada semana después de que se implantara a los ratones 1000 y 10000 células LHK2 transfectadas con el gen SMCP y células LHK2 transfectadas de forma simulada. En el gráfico, los rombos negros indican células LHK2 en que se expresó de forma forzada el gen SMCP, y los cuadrados negros indican células LHK2 transfectadas de forma simulada.

[FIG. 19] La FIG. 19 a) es el resultado de investigación del nivel de expresión del gen SMCP por un método de RT-PCR, en dos tipos de ARNip contra células transfectadas con SMCP y células transfectadas con "Stealth RNAi (marca registrada) siRNA Negative Control Hi GC n.º de catálogo 12935-400 (Invitrogen)" como control negativo. b) es un gráfico que muestra el cambio en la cantidad de células cuando se cultivaban las células respectivas en las mismas condiciones. En el gráfico, los cuadrados negros indican células LHK2 como control negativo, los triángulos negros indican células LHK2 transfectadas con SMCP1, y los círculos negros indican células LHK2 transfectadas con SMCP3.

[FIG. 20] La FIG. 20 es un gráfico de la medición del tamaño del tumor cada semana después de que a ratones NOD/SCID se les implantara 200000 células transfectadas por cada uno de dos tipos de ARNip contra SMCP y células transfectadas con "Stealth RNAi (marca registrada) siRNA Negative Control Hi GC n.º de catálogo 12935-400 (Invitrogen)" como control negativo, respectivamente. En el gráfico, los cuadrados negros indican células LHK2 como control negativo, los triángulos negros indican células LHK2 transfectadas con SMCP1 y los círculos negros indican células LHK2 transfectadas con SMCP3.

[FIG. 21] La FIG. 21 da los resultados de RT-PCR de DNAJB8 en células de tejido humano y células cancerosas cultivadas. Se usó G3PDH como control positivo.

[FIG. 22] La FIG. 22 da los resultados del análisis de citometría de flujo de células ACHN, MCF7, y RenCa y los resultados de RT-PCR de DNAJB8 con respecto a SP y MP de las células cancerosas respectivas.

[FIG. 23] La FIG. 23 es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo y el volumen del tumor cuando se implantó en ratas la fracción SP de RenCa, la fracción MP, y RenCa sin fraccionar.

[FIG. 24] La FIG. 24 a) es un mapa de una construcción plasmídica. Cada secuencia simulada, de survivina, y DNAJB8 se ha insertado en el sitio de la ventana cuadrada. b) es el resultado de transferencia de Western de un sobrenadante de cultivo de células que tienen el plásmido de a) introducido en las mismas.

[FIG. 25] La FIG. 25 es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo y el volumen del tumor implantado en ratones que tienen vacunas plasmídicas administradas a los mismos. El círculo indica el resultado de un ratón al que sea administrado PBS en lugar de la vacuna (control negativo), los cuadrados indican un ratón al que se ha administrado un plásmido con nada insertado en el mismo, los triángulos indican un ratón al que se ha administrado un plásmido con survivina insertada en el mismo, y las barras verticales indican un ratón al que se ha administrado plásmido con DNAJB8 insertado en el mismo.

[FIG. 26] La FIG. 26 a) da gráficos que muestran el cambio en la fluorescencia del anticuerpo contra HLA-A24 cuando se expone a cada péptido, y b) es un gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia media.

[FIG. 27] La FIG. 27 es un diagrama que muestra el cambio en la fracción SP en células ACHN transfectadas de

forma simulada y células ACHN en que se expresó de forma forzada DNAJB8.

[FIG. 28] La FIG. 28 da los resultados de RT-PCR de or7c1 en células de tejido maduro humano, células de tejido fetal, y células cancerosas cultivadas. Se usó G3PDH como control positivo.

[FIG. 29] La FIG. 29 da imágenes de la morfología de células Sw480 transfectadas de forma simulada, células Sw480 que expresan de forma constitutiva or7c1, y células Sw480 que tienen or7c1 inactivado por ARNip observado por un microscopio de contraste de fase, y un diagrama que muestra los resultados de RT-PCR con respecto a or7c1 de las células anteriores. Se usó G3PDH como control positivo para RT-PCR.

[FIG. 30] La FIG. 30 es un diagrama que muestra los resultados de análisis de citometría de flujo con respecto a la fracción SP de células Sw480 de tipo silvestre y células Sw480 que tienen or7c1 inactivado por ARNip.

[FIG. 31] La FIG. 31 da gráficos que muestran el cambio en el tiempo en el volumen del tumor cuando se implantó a los ratones células Sw480 transfectadas de forma simulada y células Sw480 que expresan de forma constitutiva or7c1, y un gráfico que muestra el cambio en el tiempo en el volumen del tumor cuando se implantó a los ratones células que tenían or7c1 inactivado por ARNip y células que emplean ARNip negativo.

[FIG. 32] La FIG. 32 da gráficos que muestran el cambio en la fluorescencia del anticuerpo contra HLA-A24 cuando se expone a cada péptido.

[FIG. 33] La FIG. 33 es un diagrama que muestra los resultados del ensayo ELISPOT usando péptidos para los que se observó unión en el Ejemplo experimental 32.

[FIG. 34] La FIG. 34 es un gráfico que muestra la relación entre la relación E/T y la tasa de eliminación en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr.

Mejor modo para realizar la invención

La presente invención se explica en detalle a continuación.

El marcador molecular de la presente invención es un marcador molecular para detectar células madre cancerosas en una población celular como diana de detección, detectándose el marcador molecular en células madre cancerosas contenidas en la diana de detección, pero no detectándose en células normales o células cancerosas diferentes a las células madre cancerosas. Por lo tanto, se usa típicamente para detectar células madre cancerosas a partir de una población de células cancerosas. Además, por ejemplo, cuando se recoge una población arbitraria de células como diana de detección, las células normales a veces están mezcladas en y se convierte en una población celular en que están mezcladas las células madre cancerosas, células cancerosas diferentes a células madre cancerosas, y células normales, e incluso en dicho caso pueden detectarse correctamente las células madre cancerosas.

Las "células madre cancerosas" mencionadas en la presente invención son células que, entre las células cancerosas, tienen propiedades de células madre. Las células madre son células que mantienen el potencial de diferenciación después de la división celular. Cuando las células madre cancerosas se tiñen con un colorante fluorescente Hoechst (Hoechst33342) y se someten a detección por citometría de flujo usando un láser UV (longitud de onda de aproximadamente 350 nm) como luz de excitación, se concentran en una fracción de población lateral (SP). La fracción SP mencionada aquí indica una fracción que no se tiñe por el colorante fluorescente Hoechst, como resultado de que el colorante se elimina de la célula mediante un transportador ABC, etc., en contraste con una fracción de población principal (MP) que se tiñe por el colorante.

Las "células normales" mencionadas en la presente invención significan células que tienen función normal en la actividad de un organismo o tejido vivo. Las células normales pueden contener células madre somáticas, pero son preferiblemente células maduras.

El marcador molecular de la presente invención se detecta preferiblemente en común en células madre cancerosas de una pluralidad de tipos de cáncer, y puede usarse como marcador único en una pluralidad de tipos de cáncer. Se expresa en común en células madre cancerosas de una pluralidad de tipos de cáncer derivados de células o tejido de, por ejemplo, corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, leucocitos, colon, estómago, médula ósea, intestino grueso, células mononucleares de sangre periférica, etc., y, por lo tanto, puede detectarse.

Además, el marcador molecular de la presente invención no se detecta en células cancerosas diferentes a células madre cancerosas o en células normales. Preferiblemente, no se detecta en células cancerosas diferentes a células madre cancerosas o en células normales en al menos uno de, por ejemplo, corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, leucocitos, colon, estómago, médula ósea, intestino grueso, y células mononucleares de sangre periférica.

El marcador molecular de la presente invención puede expresarse o detectarse en células madre cancerosas, pero no puede expresarse o detectarse en células normales, y, por lo tanto, es posible detectar células madre cancerosas en una población celular recogida de forma arbitraria de células o tejido que contienen células madre cancerosas.

Para usarlo como marcador molecular versátil, es preferible usarlo como marcador único en una pluralidad de tipos de cáncer, y típicamente no se detectan células normales de al menos dos tipos de células o tejido de corazón,

cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, leucocitos, colon, estómago, médula ósea, intestino grueso, células mononucleares de sangre periférica, etc., y no se detecta preferiblemente en al menos tres de los mismos. Muy preferiblemente no se detecta en células normales de todos los tipos de células o tejido.

5 La "expresión génica" mencionada en la presente memoria descriptiva significa una serie de reacciones biológicas con la transcripción génica como punto de partida, y el "producto de expresión" significa una molécula tal como, por ejemplo, ARNm o polipéptido endógeno, generada por esta serie de reacciones biológicas.

10 Además, "que se expresa" mencionado en la presente memoria descriptiva significa que un producto de expresión puede identificarse por un método conocido para un experto en la materia, tal como, por ejemplo, RT-PCR, hibridación *in situ*, inmunoensayo, o un método cromatográfico. Además, "que no se detecta" significa que no se identifica producto de expresión por los métodos mencionados anteriormente para identificar un producto de expresión. Además, incluso si existe una señal detectada por un método de detección que tiene muy alta
15 sensibilidad tal como, por ejemplo, RT-PCR, cuando hay una gran diferencia en las intensidades de señal, o cuando está por debajo del nivel de detección en un método de detección tal como un inmunoensayo que tiene suficiente sensibilidad desde el punto de vista de la viabilidad en la realización de la presente invención, se incluye en la definición "que no se detecta" en la presente memoria descriptiva.

20 Un producto de expresión de un gen detectado por la presente invención (* = no de acuerdo con la invención) es preferiblemente un producto de expresión de un gen que tiene una secuencia conocida, pero puede ser un homólogo de la misma. Es preferiblemente un producto de expresión de un gen que tiene una de las siguientes secuencias de ARNm o ADNc.

25 *Sox2: N.º de acceso del gen NM_003106
*Smcp: N.º de acceso del gen NM_030663
*Ints1: N.º de acceso del gen NM_001080453
*Kox12: N.º de acceso del gen NM_152907
*Mdf1: N.º de acceso del gen NM_005586
30 *FLJ13464: N.º de acceso del gen AK023526
*667J232: N.º de acceso del gen AL833225
*Surf6: N.º de acceso del gen NM_006753
*Pcdh19: N.º de acceso del gen NM_001105243
*Dchs2: N.º de acceso del gen NM_017639
35 *Pcdh21: N.º de acceso del gen NM_033100
*Gal3st1: N.º de acceso del gen NM_004861
*Ras11b: N.º de acceso del gen NM_023940
*Hes6: N.º de acceso del gen NM_018645
*Znf415: N.º de acceso del gen NM_018355
40 *Nkx2-5: N.º de acceso del gen NM_004387
*Pamci: N.º de acceso del gen NM_005447
*Pnmt: N.º de acceso del gen NM_002686
*Scgb3a1: N.º de acceso del gen NM_052863
*Or7c1: N.º de acceso del gen NM_198944
45 Dnajb8: N.º de acceso del gen NM_153330

La diana de determinación en la presente invención es preferiblemente un tejido humano, derivado de ser humano, y/o células derivadas de ser humano, pero puede ser un animal diferente a un ser humano (por ejemplo, roedores tales como ratón, rata, cobaya o hámster, primates tales como chimpancé, artiodáctilos tales como ganado bovino,
50 cabra, u oveja, perisodáctilos tales como caballos, conejo, perro, gato, etc.), dicho tejido derivado de animal, y/o dichas células derivadas de animal.

Con respecto a la determinación, cuando se detecta el marcador molecular de la presente invención, se determina que hay células madre cancerosas, y la diana de determinación puede contener células normales y/o células cancerosas diferentes a células madre cancerosas. Desde el punto de vista de la capacidad de utilizarse como
55 marcador único en una pluralidad de tipos de cáncer, la determinación se realiza detectando preferiblemente productos de expresión de Sox2, Smcp, Ints1, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Ras11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, Scgb3a1, Or7c1, y Dnajb8, y muy preferiblemente un producto de expresión de Sox2.

60 Cuando el marcador molecular de la presente invención es ARNm, se usa un reactivo que se une específicamente a ARNm tal como una sonda o un cebador para la detección del mismo. Desde el punto de vista del nivel de sensibilidad de detección o simplicidad de funcionamiento, se detecta por un método de RT-PCR.

65 Cuando el marcador molecular de la presente invención es un polipéptido endógeno, se usa un reactivo que se une específicamente a un péptido tal como un anticuerpo o un ligando para la detección del mismo. Por ejemplo, con

respecto a un anticuerpo, puede usarse un anticuerpo policlonal y/o un anticuerpo monoclonal. Desde el punto de vista de una reacción no específica que es inferior, es preferible usar un anticuerpo monoclonal.

La determinación puede realizarse *in vivo* o *in vitro*. "Determinación *in vitro*" mencionado en la presente memoria descriptiva significa determinación que se realiza después de que se haya cultivado tejido o células recogidas de un organismo vivo en un entorno fuera de un organismo vivo, tal como, por ejemplo, un líquido de cultivo. En contraste con ello, "determinación *in vivo*" significa determinación que se realiza directamente dentro de un organismo vivo o, después de recoger tejido o células de un organismo vivo, determinación que se realiza inmediatamente o después de la inmovilización. La recogida de tejido o células se realiza por, aunque sin limitación, por ejemplo, incisión, succión de células, recogida de sangre, recogida de orina, etc.

Cuando la determinación se realiza *in vivo*, puede emplearse un método de detección *in vivo* conocido para los expertos en la materia. La determinación *in vivo* puede realizarse por un método de detección conocido tal como un ensayo de sangre, hibridación *in situ*, PCR *in situ*, o tinción inmunohistoquímica.

Cuando la determinación se realiza *in vitro*, puede realizarse por, aunque sin limitación, por ejemplo, un método de detección *in vitro* conocido para los expertos en la materia tal como tinción inmunohistoquímica o RT-PCR. Cuando se realiza RT-PCR, la cantidad de ciclos es preferiblemente 30 a 35 ciclos. La determinación en tejido tumoral después de cultivar el tejido, también se incluye en determinación *in vitro*.

Como el marcador molecular de la presente invención se expresa específicamente en células madre cancerosas, se espera que la cantidad detectada tenga una correlación con la cantidad de células madre cancerosas. Por lo tanto, antes y después de administrar un compuesto candidato a una diana, si la cantidad del marcador molecular de la presente invención detectada ha disminuido, puede esperarse que la cantidad de células madre cancerosas haya disminuido. Es decir, comparando la cantidad de marcador molecular detectada antes de la administración y la de después, es posible detectar compuestos que son candidatos para un agente terapéutico para células madre cancerosas. Por lo tanto, dicho método de detección también se incluye en la presente divulgación.

Además, la presente divulgación incluye un kit que contiene un reactivo para detectar el marcador molecular. El kit contiene, por ejemplo, para detectar ARNm, un reactivo que detecta específicamente ARNm, tal como una sonda o un cebador y, para detectar polipéptido, un reactivo que detecta específicamente polipéptido, tal como un ligando o un anticuerpo. El kit contiene al menos uno de los reactivos mencionados anteriormente. El kit puede contener un reactivo adjunto adecuado para la forma de aplicación, tal como, por ejemplo, un tampón de reacción o un promotor de reacción.

Desde el punto de vista de un único kit que se utiliza en una pluralidad de tipos de cáncer, preferiblemente contiene un reactivo que detecta un producto génico de la secuencia génica Sox2, Smcp, Intsi, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl1b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, Scgb3a1, Or7c1, o Dnajb8, y muy preferiblemente Sox2.

La "sonda y/o cebador que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a un gen" mencionada en la presente invención es ADN o ARN que tiene una secuencia complementaria para que se una específicamente a una secuencia parcial de la secuencia génica, y puede estar opcionalmente marcado con, por ejemplo, un marcador fluorescente o un marcador de radioisótopo.

También se incluye en la presente divulgación un método para determinar si una diana de determinación es un cáncer o no detectando células madre cancerosas usando el kit mencionado anteriormente.

Puede usarse un polipéptido que funciona como un marcador molecular de la presente invención como antígeno para inhibir la función de células madre cancerosas o eliminarlas. Estos polipéptidos pueden tener un sitio funcional tal como, por ejemplo, un sitio de reconocimiento de anticuerpo o un sitio de unión a proteína, que puede tener una longitud de, por ejemplo, 9 a 11 aminoácidos. En un caso en que aparece un sitio funcional después de alguna modificación o transformación, tal como, por ejemplo, un caso en que se reconoce una estructura tridimensional proteica por un anticuerpo, un caso en que se reconoce un multímero por un anticuerpo, o un caso en que se forma un sitio de reconocimiento de anticuerpo por la unión de un grupo de modificación, los polipéptidos también pueden tener esta estructura de sitio funcional. Estos polipéptidos se obtienen preferiblemente de productos de expresión de genes seleccionados del grupo que consiste en Sox2, Smcp, Intsi, Kox12, Mdf1, FLJ13464, 667J232, Surf6, Pcdh19, Dchs2, Pcdh21, Gal3st1, Rasl11b, Hes6, Znf415, Nkx2-5, Pamci, Pnmt, Scgb3a1, Or7c1, y Dnajb8.

Ejemplos del método para eliminar células madre cancerosas usando estos polipéptidos como antígeno incluyen, aunque sin limitación, un método que implica inducción de CTL, un método en que se causa una inmunorreacción utilizando un anticuerpo específico de polipéptido, y un método en que se inhibe o antagoniza la función por unión a un polipéptido.

Cuando un epítipo derivado de un producto de expresión del gen de la presente invención se une a un anticuerpo que reacciona específicamente con el mismo, el anticuerpo unido se convierte en una señal para activar así una

inmunorreacción. Como el propio epítipo es un marcador molecular o una estructura parcial del mismo que se expresa específicamente en células madre cancerosas, esto sugiere fuertemente que la unión de un anticuerpo específico posibilita una cascada inmunitaria que reconoce específicamente células madre cancerosas a activarse. Además, también es posible usar un anticuerpo conjugado con un fármaco que ataca células cancerosas, etc.

5 Posibilitan la aplicación a la terapia llamada de proyectil en que se abordan células madre cancerosas.

Por lo tanto, un anticuerpo usado en el método mencionado anteriormente y una composición farmacéutica que contiene un polipéptido y/o un anticuerpo también se incluyen en la presente divulgación.

10 Ejemplos de la composición farmacéutica incluyen, aunque sin limitación una vacuna contra el cáncer y un agente antineoplásico. Estas composiciones pueden contener, además del polipéptido y/o anticuerpo de la presente divulgación, por ejemplo, un fármaco que tiene actividad antitumoral, un adyuvante, un vehículo farmacéuticamente aceptable, etc., según lo necesario.

15 Además, un ácido nucleico que codifica el polipéptido mencionado anteriormente y una composición farmacéutica que contiene el ácido nucleico también se incluyen en la presente divulgación. Ejemplos de la composición farmacéutica que contiene el ácido nucleico incluyen, aunque sin limitación, una vacuna de ADN. Estas composiciones pueden contener además del ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, un fármaco que tiene actividad antitumoral, un adyuvante, un vehículo farmacéuticamente aceptable, etc., según lo necesario.

20 Entre los fragmentos polipeptídicos que son el marcador molecular de la presente invención, están aquellos que se presentan como antígeno por una proteína llamada complejo principal de histocompatibilidad (molécula MHC). Las células T citotóxicas (CTL) reconocen un antígeno específico unido a una molécula MHC clase I y causan una inmunorreacción que induce apoptosis de las células presentadoras de antígeno.

25 Como resultado de la investigación por los presentes inventores, se ha descubierto que, entre los polipéptidos derivados del marcador molecular de la presente invención, una parte de los polipéptidos muestra una alta afinidad por HLA-A24. Que es una de las moléculas MHC humanas, y se ha descubierto adicionalmente que algunos de ellos tienen la capacidad de inducir CTL y conducir a las células a apoptosis. Este resultado sugiere fuertemente que el polipéptido de la presente invención puede dar memoria inmunológica con respecto a células madre cancerosas. Esto muestra sustancialmente que el polipéptido de la presente invención puede aplicarse a un método para tratar específicamente células madre cancerosas.

30 Se sugiere que, como el marcador molecular de la presente invención se expresa específicamente en células madre cancerosas, alguna parte del polipéptido se presenta como antígeno mediante moléculas MHC. La detección de polipéptidos (péptidos epitópicos) que se presentan como antígeno mediante moléculas MHC es útil en el tratamiento del cancer. Por lo tanto, dicho método de detección también se incluye en la presente divulgación.

35 La detección puede emplear un método de mapeo de epítipos normal. Por ejemplo, después de preparar una pluralidad de tipos de péptido fragmentado que tiene una longitud apropiada a partir de un polipéptido diana, el polipéptido diana y/o el péptido fragmentado, las células presentadoras de antígeno, y las células T se cultivan juntos para sensibilizar de ese modo las células T. Las células T sensibilizadas, las células presentadoras de antígeno, y el péptido fragmentado después se cultivan juntos, reestimulando de ese modo las células T. El grado de activación de las células T entonces se mide, se seleccionan los péptidos que tienen un alto grado de activación y se determina una secuencia epitópica. En este caso, el grado de activación puede determinarse según lo apropiado por un método conocido para los expertos en la materia tal como medición de la actividad citotóxica o cantidad de citoquina producida. Además, especificando el tipo HLA de las células T, se selecciona un péptido antigénico que está restringido por el tipo específico de HLA.

40 El ADN que funciona como marcador molecular de la presente invención es ADN que se expresa específicamente en células madre cancerosas, y se cree que suprimiendo la expresión del mismo puede suprimirse la función de las células madre cancerosas. Por lo tanto, un ácido nucleico para suprimir la expresión de ADN que funciona como marcador molecular de la presente invención también se incluye en la presente invención.

45 Ejemplos del método para suprimir la expresión incluyen, aunque sin limitación, iARN o expresión de un represor. Por lo tanto, ejemplos de ácidos nucleicos para suprimir la expresión de ADN incluyen, aunque sin limitación, ARNip, ARNhc, y ADNhc. El ácido nucleico puede tener cualquier longitud siempre que sea una cantidad suficiente de bases para suprimir la expresión de ADN.

50 Diferente al ADN y el ARN, el ácido nucleico puede incluir un análogo de ácido nucleico, pero desde el punto de vista de la versatilidad es preferiblemente ADN y/o ARN.

55 Se sugiere que existe la posibilidad de que las células madre cancerosas, se vean atacadas de forma específica y/o eficaz por la supresión de la expresión del ADN que funciona como marcador molecular de la presente invención. Es decir, se sugiere que el ácido nucleico mencionado anteriormente puede aplicarse para terapia de transferencia génica. Por lo tanto, una composición farmacéutica que contiene el ácido nucleico de la presente invención también

se incluye en la presente divulgación.

La composición farmacéutica mencionada anteriormente puede usarse como, por ejemplo, un agente terapéutico contra el cáncer tal como un agente antineoplásico, un inhibidor de la metástasis, o una vacuna contra el cáncer tal como una vacuna de ADN, pero no se limita a ello. Estas composiciones farmacéuticas pueden contener, además del ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, un fármaco que tiene actividad antitumoral, un adyuvante, un vehículo farmacéuticamente aceptable, etc., según lo necesario.

Además, un método de supresión de la expresión del ADN que funciona como marcador molecular de la presente invención en células madre cancerosas usando el ácido nucleico de la presente invención también se incluye en la presente divulgación.

Los siguientes ejemplos experimentales son para explicar la presente invención más específicamente, pero no limitan el alcance de la presente invención. Un experto en la materia que tiene conocimientos y habilidades habituales puede modificar en una diversidad de formas las realizaciones mostradas en los siguientes Ejemplos experimentales siempre que las modificaciones no se alejen del espíritu de la presente invención, y dichas realizaciones modificadas también se incluyen en la presente invención.

[Ejemplo 1]

Ejemplo experimental 1: aislamiento de la fracción SP de células cancerosas

a) Preparación de reactivo

Se preparó un medio DMEM que contenía antisero bovino fetal (FCS) al 5 %, y se calentó hasta 37 °C. Se preparó Verapamil 50 mM, y se diluyó a 5 mM con FCS al 5 % + DMEM. Se ajustó Hoechst 33342 a 250 µg/ml con FCS al 5 % + DMEM. Se ajustó DNasal a 1 mg/ml con DDW, y se sometió a esterilización por filtración usando un filtro de 0,2 µm.

b) Preparación de células para citometría de flujo (FACS)

Se suspendieron las células en 4 ml de FCS al 5 % + DMEM, y se contó la cantidad de células. Además, se ajustó la concentración de células a 1×10^6 recuentos/ml añadiendo FCS al 5 % + DMEM, y se muestreó 1 ml en un tubo Falcon para verapamil (+). Las células verapamil (+) y las células restantes (para verapamil (-)) se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, se añadió una solución de verapamil a verapamil (+) de modo que la concentración final de verapamil llegara a ser de 50 a 75 µM y después se añadió una solución de Hoechst 33342 a verapamil (+) y verapamil (-) de modo que la concentración final de Hoechst 33342 llegara a ser de 2,5 µM a 5,0 µM.

Las células se incubaron a 37 °C durante 90 minutos con agitación, inmediatamente seguido por enfriamiento en hielo. La centrifugación se realizó a 1100 hasta 1500 r.p.m. a 4 °C durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se suspendieron con 1 x PBS + FCS al 5 %, y la suspensión se transfirió a un tubo FACS enfriado en hielo. La centrifugación se realizó de nuevo a 1100 hasta 1500 r.p.m. a 4 °C durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante, y las células se suspendieron con 1 x PBS + FCS al 5 %. La centrifugación se realizó una vez más a 1100 hasta 1500 r.p.m. a 4 °C durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante, y las células se suspendieron con 500 µl de 1 x PBS + FCS al 5 % al que se añadió EDTA a una concentración final de 2 mM. Se añadieron 0,5 µl de solución de DNasal, se realizó el pipeteo, y se pasó a través de un filtro para FACS. Se añadieron 0,5 µl de 1 mg/ml de yoduro de propidio (PI), y se realizó FACS a un caudal de 1000 hasta 2000 recuentos/s.

c) Citometría de flujo (FACS)

El citómetro de flujo usado fue un BD FACS Aria II edición especial (marca registrada) (Becton, Dickinson and Company). La operación FACS se realizó de acuerdo con el manual de instrucciones. En primer lugar, se confirmó si podían detectarse o no células de la fracción SP pasando células de verapamil (-); después de la confirmación, se pasaron células verapamil (+) sincronizando la fracción SP, confirmando de ese modo si desaparecían las células de la fracción SP o no. Si desaparecían, se determinó que las células de la fracción eran células de la fracción SP, y entonces se aislaron las células de la fracción. Las células aisladas se sometieron a centrifugación a 4 °C y 1500 r.p.m. durante 15 minutos, retirando el sobrenadante, y se suspendieron con 100 a 200 µl de 1 x PBS, y se contó la cantidad de células.

A partir de los resultados, se detectaron las células de la fracción SP en adenocarcinoma A549 y LHK2 y cáncer de células escamosas Lc817. Los resultados se muestran en la FIG. 1.

Análisis

La detección de las células de la fracción SP en adenocarcinoma y cáncer de células escamosas que son de un tipo

en que aparece fácilmente metástasis entre cánceres pulmonares, coincide con el hallazgo de que las células madre cancerosas son la causa principal de metástasis.

[Ejemplo 2]

Ejemplo experimental 2: experimento de tumorigenicidad

La tumorigenicidad se confirmó inoculando ratones con células SP fraccionadas y células MP usando cada una de las líneas celulares LHK2, MCF7, y SW480 por el mismo método que en el Ejemplo experimental 1. Se suspendió la misma cantidad de células SP y células MP en 100 µl de 1 x PBS en hielo y se mezclaron con 100 µl de Matrigel. Se inocularon ratones NOD/SCID (obtenido de Oriental Kobo Co., Ltd.) por vía subcutánea en la piel dorsal con 100 µl de un líquido de mezcla de células-Matrigel a 1500 células por sitio de cada una de células SP y MP; cuando empezó a formarse un tumor, se midieron las longitudes del diámetro más largo y el diámetro más corto, y se calculó el volumen aproximado a un esferoide y se comparó. Los resultados se muestran en la FIG. 2.

A partir de los resultados, se descubrió que, en comparación con las células MP, que no formaban un tumor en ni siquiera un ratón cuando se le implantaba 150 células, las células SP fraccionadas de LHK2 tenían tumorigenicidad mucho mayor de modo que 2 de 5 ratones formaron un tumor cuando se les implantaba solamente 15 células y los 5 ratones formaron un tumor cuando se les implantaban 150 células. Esto coincidió con el hallazgo de que las células madre cancerosas son el factor principal en la formación de tumores y las células madre cancerosas se concentran en células de la fracción SP. (Referencia Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 20: 781-786, 2004.)

[Ejemplo 3]

Ejemplo experimental 3: confirmación de la expresión por microserie de ADN

a) Extracción de ARNm

Se centrifugaron células SP y células MP aisladas por el mismo método que en el Ejemplo experimental 1 a temperatura ambiente a 1500 r.p.m. durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante. La extracción de ARNm se realizó usando un kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del kit.

b) Amplificación y marcaje de ARNm

El ARNm extraído se sometió a amplificación de ARNm usando un kit de amplificación de ARN obtenido de Sigma Genosys, y el ARNm amplificado se sometió a marcaje usando un kit de marcaje de ARNm obtenido de Sigma Genosys de modo que el material extraído de la fracción SP se marcó con Cy5 y el material extraído de la fracción MP se marcó con Cy3, y se intercambiaron los colorantes, y lo extraído de la fracción SP se marcó con Cy3 y lo extraído de la fracción MP se marcó con Cy5.

c) Microserie

El ARNm derivado de la fracción SP y el ARNm derivado de la fracción MP, que se habían marcado con diferentes colorantes, se mezclaron, y se analizaron para la expresión de ARNm usando un chip de ADN (Panorama (marca registrada) Micro Array, Human) obtenido de Sigma Genosys hibridado de acuerdo con el protocolo del kit de la microserie. A partir de los resultados, se confirmó que el gen Sox2, el gen Smcp, el gen Ints1, el gen Kox12, el gen Mdf1, el gen FLJ13464, el gen 667J232, el gen Surf6, el gen Pcdh19, el gen Dchs2, el gen Pcdh21, el gen Gal3st1, el gen Rasl1b, el gen Hes6, el gen Znf415, el gen Nkx2-5, el gen Pamci, el gen Pnmt, el gen Scgb3a1, el gen Or7c1, y Dnajb8 se expresaban en la fracción SP, pero no se expresaban en la fracción MP o a un nivel insignificante, si acaso.

[Ejemplo 4]

Ejemplo experimental 4: expresión de Sox2

a) Cebador usado en RT-PCR

Se muestra una lista de cebadores usados en RT-PCR en los Ejemplos experimentales en la Tabla 1

[Tabla 1]

	Cebador directo	Cebador inverso
Sox2	actttgtcggagacggaga	gttcattgtcgcgtaactgt
Smcp	tgtgtgaccagacaaaacacag	gttgggctcagactccatgt
Ints1	tgtccagcatgagcaaactc	aaaccgtagcagggtcacac

(continuación)

	Cebador directo	Cebador inverso
Kox12 (Znf19)	atgtggaaaagcaccaggac	tcctctggtgccgaattaac
Mdf1	caggaagactgctgtgtcca	atgcagatctccaggcagtc
FLJ13464	tgcataacaccaaagggtcca	gacctggccaatacaatgct
667J232	aggacatgcctgggtgatag	cccaatcctgagttcttcca
Surf 6	cgactgcatgagaagatcca	gaggaggttggtccacttca
Pcdh19	cccaagggtcaacagcggtat	cacaccaggggactcttctg
Dchs2	gaaggagatcaaggggaagg	atcaaaggggggtggaaaaac
Pcdh21	atgcagaggaaccaacaac	tgagtaaggctgtggtgctg
Gal3st1	ggcctgcttcaacatcatct	gctgtgtcatagcccagggt
Raslllb	tgtggtgatcggttttctcca	agggaggttcttcgcttctc
Hes6	agctcctgaaccatctgctc	agcaggagcctgactcagtt
Znf415	cttgcaaggcattggagaat	taggcttgaatgcacactga
Nkx2-5	acgcccttctcagtcaaaga	tttcggctctagggtcctt
Pamci (Rassf9)	tgatcattcccaggacat	ccctccgcatcttcattta
Pnmt	gaatgctggcaggataagga	ctttagccactacgcacca
Scgb3a1	ctccgctgctgctttcttag	ccagctcagccacacactt
Or7c1 (Tpcr86)	agctctgtggactgctggtt	ggacgccagttgcaaagtat
Dnajb8	ccgacaagaacctgacaat	aggtggatgagaaggtggtg
G3PDH	accacagtccatgccatcac	tccaccaccctgttgctgta

b) Expresión de Sox2 en células normales

- 5 Para confirmar adicionalmente la utilidad de Sox2, que se había confirmado en el Ejemplo experimental 3c), se examinó la expresión del mismo en células normales adultas humanas. Se realizó RT-PCR usando un panel de ARNm derivado de tejido normal adulto humano obtenido de Clontech. El panel de ARNm incluye ARNm derivado de célula o tejido normal adulto de cada uno de corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, intestino grueso, y células mononucleares de sangre periférica.

En primer lugar, se sintetizó el ADNc a partir del ARNm usando una enzima de transcripción inversa SuperScript (marca registrada) III (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del kit.

- 15 El ADNc así sintetizado se sometió a amplificación de ADNc de Sox2 por RT-PCR usando el cebador directo y el cebador inverso (véase la Tabla 1). Como control, se amplificó el ADNc de G3PDH por el mismo método. Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2		
94 °C	2 min	-
94 °C	15 s	30 a 35 ciclos
58 °C a 60 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	2 min	-

(no de acuerdo con la invención)

El producto de amplificación así amplificado se sometió a electroforesis a 100 V durante 25 minutos usando gel de agarosa al 1,5 %. Los resultados se muestran en la FIG. 3a).

c) Expresión de Sox2 en línea celular cancerosas

La línea celular de cáncer pulmonar LHK2, las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y KM12LM, y la línea celular de cáncer de mama MCF7 se separaron en la fracción SP y la fracción MP del mismo modo que en el Ejemplo experimental 1. Se extrajo el ARNm de la fracción SP y la fracción MP de lo anterior del mismo modo en el Ejemplo experimental 3a) y el ADNc se sintetizó del mismo modo que en el Ejemplo experimental 4b). Se amplificó el ADNc de Sox2 usando un cebador de Sox2 (véase la Tabla 1) en las condiciones de la Tabla 2, y el producto de amplificación se sometió a electroforesis a 100 V durante 25 minutos usando gel de agarosa al 1,5 %. Los resultados se muestran en la FIG. 3b).

Análisis

No se observó de expresión de Sox2 en tejido normal adulto humano. Esto sugiere que Sox2 es un marcador que no reconoce células normales en el tejido, y también sugiere la posibilidad de tratar específicamente células tumorales

mediante el uso de Sox2. Como resultado del examen de las células de las fracciones SP y MP de las 4 líneas LHK2, SW480, KM12LM, y MCF7, se observó fuerte expresión en las células de la fracción SP para todas las líneas, pero apenas hubo algo de expresión en las células de la fracción MP lo que sugiere la posibilidad de usar Sox2 como marcador que es específico para células de la fracción SP, es decir, células madre cancerosas.

[Ejemplo 5]

Ejemplo experimental 5: expresión de Smcp y FLJ13464 (no de acuerdo con la invención)

Para confirmar adicionalmente la utilidad de Smcp y FLJ13464, que se confirmaron en el Ejemplo experimental 3c), se examinó la expresión de los mismos en tejido normal adulto humano y otras células cancerosas. El tejido normal adulto humano empleado en este experimento, se obtuvo de un panel de ARNm de tejido normal adulto humano obtenido de Clontech que contenía corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, leucocitos, colon, estómago, y médula ósea, y las células cancerosas empleadas fueron la línea celular de cáncer pulmonar LHK2, las líneas celulares de cáncer colorrectal SW480 y KM12LM, la línea celular de cáncer de mama MCF7, y la línea celular de histiocitoma fibroso maligno MFH03.

Se sintetizó el ADNc a partir del ARNm de cada célula y tejido del mismo modo que en Ejemplo experimental 4b). El ADNc así sintetizado se sometió a amplificación de ADNc de Smcp y FLJ13464 usando el cebador directo y el cebador inverso de Smcp (véase la Tabla 1) y el cebador directo y el cebador inverso de FLJ13464 (véase la Tabla 1) en las condiciones de PCR mostradas en la Tabla 2. Como control, se amplificó el ADNc de G3PDH por el mismo método que el anterior. Los productos de amplificación así amplificados se sometieron a electroforesis a 100 V durante 25 minutos usando gel de agarosa al 1,5 %. Los resultados se muestran en la FIG. 4a).

Del mismo modo que en el Ejemplo experimental 4, se sintetizó el ADNc de las células de la fracción SP y MP de SW480, KM12, LHK2, y MCF7, se amplificó el ADNc usando un conjunto de cebadores de amplificación de Smcp y FLJ13464, y los productos de amplificación se sometieron a electroforesis de agarosa. Los resultados se muestran en la FIG. 4B).

Análisis

No se observó expresión de Smcp y FLJ13464 en casi todo el tejido normal adulto humano; se expresó FLJ13464 en páncreas y estómago y se expresó Smcp en testículo en algún grado. Esto sugiere que para casi todos los tejidos Smcp y FLJ13464 son marcadores que no reconocen células normales en tejido, lo que sugiere la posibilidad de un tratamiento específico de células tumorales en tejido donde no se observa expresión en células normales. Además, del mismo modo que para los resultados del Ejemplo experimental 4, como Smcp se expresaba específicamente en las células de la fracción SP de SW480, KM12, LHK2, y MCF7, y FLJ13464 se expresaba específicamente en las células de la fracción SP de MCF7, los resultados demuestran la posibilidad de usar Smcp y FLJ13464 como marcadores específicos de células cancerosas.

[Ejemplo 6]

Ejemplo experimental 6: expresión de otros genes

Se confirmó la expresión de otros genes en células normales del mismo modo que en el Ejemplo experimental 5. Los resultados se muestran en la FIG. 5 como un diagrama.

[Ejemplo 7]

Ejemplo experimental 7: expresión de Sox2 en otras líneas celulares (no de acuerdo con la invención)

Para examinar en detalle si se expresa Sox2 o no en líneas celulares cancerosas diferentes a las examinadas en el Ejemplo experimental 4, se confirmó la expresión de Sox2 del mismo modo que en el Ejemplo experimental 4 con respecto a 14 tipos de líneas celulares de cáncer pulmonar, 3 tipos de líneas celulares de cáncer de células renales, 1 tipo de línea celular de cáncer de próstata, y células HeLa que derivan de una línea celular de cáncer de cuello del útero. Se usaron células cerebrales fetales como control positivo, y se usó agua bidestilada como control negativo. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

Análisis

Se confirmó la expresión de Sox2 en todas las líneas celulares cancerosas examinadas. Esto sugiere que Sox2 funciona como marcador molecular de células madre cancerosas para muchos más tipos de líneas celulares cancerosas que otros marcadores moleculares de células madre cancerosas actualmente conocidos. Además, la expresión común a una diversidad de líneas celulares sugiere que Sox2 puede llegar a ser una diana para terapia contra el cáncer independientemente de la parte del organismo.

[Ejemplo 8]

Ejemplo experimental 8: expresión de Smcp en otras células cancerosas (no de acuerdo con la invención)

Se examinó en detalle si Smcp se expresa o no en otras líneas celulares cancerosas del mismo modo que en el Ejemplo experimental 5. Se confirmó la expresión de Smcp del mismo modo que en el Ejemplo experimental 5 usando 6 tipos de líneas celulares de cáncer de células renales, 7 tipos de líneas celulares de cáncer pulmonar, y 1 tipo de línea celular de cáncer de próstata como líneas celulares cancerosas. Se usaron células de testículo como control positivo, y se usaron células de cáncer pulmonar de ratón como control negativo. Los resultados de la PCR realizada con números de ciclo de 35 ciclos y 40 ciclos se muestran en la FIG. 7.

Análisis

Se confirmó la expresión de Smcp en todas las líneas celulares cancerosas examinadas. Esto sugiere que, del mismo modo que para Sox2, Smcp funciona como un marcador molecular para muchos tipos de líneas celulares cancerosas que los marcadores moleculares de células madre cancerosas conocidos y que existe una posibilidad de su uso como diana en terapia.

[Ejemplo 9]

Ejemplo experimental 9: expresión de Ints1 en células normales, y otras células cancerosas, y líneas celulares cancerosas (no de acuerdo con la invención)

a) Expresión en células normales y otras células cancerosas

Para confirmar adicionalmente la utilidad de Ints1, que se confirmó en el Ejemplo experimental 3c), se examinó la expresión en células normales adultas humanas y otras células cancerosas del mismo modo que en el Ejemplo experimental 5 usando el cebador directo y el cebador inverso de Ints1 (véase la Tabla 1). Los resultados se muestran en la FIG. 8 a).

b) Expresión en otras líneas celulares cancerosas

Se confirmó la expresión de Ints1 en otras líneas celulares cancerosas usando las mismas líneas celulares que en el Ejemplo experimental 8. Los resultados se muestran en la FIG. 8 b).

Análisis

Con respecto a células normales, no se confirmó la expresión de Ints1 diferente a una muy ligera expresión que se observa en el páncreas y el bazo. Este resultado sugiere que, en casi todos los tejidos, Ints1 es un marcador que no reconoce células normales en tejido, y existe una posibilidad de realizar terapia específica de células tumorales en tejido donde no se observaba expresión en células normales y también, en el páncreas y el bazo, donde se observó expresión, dependiendo de la sensibilidad de detección. Además, del mismo modo que en el resultado del Ejemplo experimental 4, SW480, KM12, LHK2, y MCF7 también, la expresión fue sustancialmente específica de células SP, lo que sugiere que es útil como marcador de células madre cancerosas.

Con respecto a otras líneas celulares, se confirmó la expresión para la mayoría de las líneas celulares cancerosas con pocas excepciones. Esto sugiere que Ints1 funciona como un marcador molecular para muchos más tipos de líneas celulares cancerosas que los marcadores moleculares de células madre cancerosas conocidos y que existe una posibilidad de su uso como diana en terapia.

[Ejemplo 10]

Ejemplo experimental 10: tinción inmunohistoquímica de tejido de cáncer pulmonar usando anticuerpo anti-SOX2 (no de acuerdo con la invención)

Se realizó tinción inmunohistoquímica de tejido de cáncer pulmonar usando un anticuerpo policlonal anti-SOX2 (ZYMED Inc.). Una sección incrustada en parafina de cáncer pulmonar humano fijada por una solución de fijación de formalina al 20 % se sometió a un tratamiento de desparafinización usando alcohol etílico. La sección se sumergió en un tampón ácido cítrico de 0,01 mol/l (pH 6,0) y se sometió a autoclave a 110 °C durante 5 minutos para realizar de ese modo la recuperación del antígeno. Se depositaron 0,5 ml de anticuerpo policlonal anti-SOX2 sobre la sección, y la sección se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La sección entonces se lavó con PBS-T (Tween 20 al 0,05 %/PBS, pH 7,4) tres veces. Como anticuerpo secundario, se depositó un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Simple Stain MAX-PO, Nichirei Corporation) sobre la sección, y la sección se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se lavó con PBS-T tres veces. La sección se sumergió en un líquido mixto de peróxido de hidrógeno acuoso y sustrato DAB (Simple Stain MAX-PO, Nichirei Corporation),

realizando de ese modo una reacción de color durante 1 a 2 minutos. La sección después se lavó con tampón de procesamiento durante 1 minuto, y se sometió a tinción nuclear con hematoxilina durante 1 a 2 minutos. Los resultados se muestran en la FIG. 9.

5 Análisis

La proteína antigénica SOX2 se tiñó de marrón. Además de algunas de las células que se tiñen de marrón oscuro, una parte correspondiente al borde invasivo del tumor se tiñó ligeramente en forma de banda. Este resultado sugiere que la inmunotinción usando un anticuerpo anti-SOX2 posibilita aclarar la morfología, la cantidad y la posición de células madre cancerosas en tejido de cáncer pulmonar.
[Ejemplo 11]

Ejemplo experimental 11: tinción inmunohistoquímica de tejido de cáncer de mama usando anticuerpo anti-SOX2 (no de acuerdo con la invención)

Tejido de cáncer de mama de tipo basaloide se sometió a tinción inmunohistoquímica del mismo modo que en el Ejemplo experimental 10. Como ejemplo comparativo, también se realizó tinción para CK (citoqueratina), que es un marcador de células basales. Los resultados se muestran en la FIG. 10. También se observó tinción marrón de proteína antigénica SOX2 en el tejido de cáncer de mama. Esto sugiere que SOX2 puede aclarar la morfología, la cantidad y la posición de células madre cancerosas también en cáncer de mama. Es generalmente conocido que el cáncer de mama de tipo basaloide tiene un mal pronóstico y una alta tasa de metástasis, y se sugiere que SOX2 podría estar implicado en el mismo.

[Ejemplo 12]

Ejemplo experimental 12: tinción inmunohistoquímica de tejido normal usando anticuerpo anti-SOX2 (no de acuerdo con la invención)

Se realizó tinción inmunohistoquímica de tejido normal de cerebro, pulmón, estómago, y páncreas del mismo modo que en Ejemplo experimental 10. Los resultados se muestran en la FIG. 11. Se observó una imagen teñida de oscuro del núcleo en solamente una parte muy pequeña del estómago, pero no se observó expresión en los otros tejidos. Esto demuestra que SOX2 se expresa muy poco en tejido normal.

[Ejemplo 13]

Ejemplo experimental 13: cambio en la capacidad tumorigénica por expresión forzada de SOX2 (no de acuerdo con la invención)

Se inocularon ratones NOD/SCID de forma subcutánea en la piel dorsal de la izquierda y la derecha con 10000 células de cada tipo de células donde SOX2 se había expresado de forma forzada (células LHK2-SOX2) y células transfectadas de forma simulada (células LHK2-simulado) como 100 µl de líquidos mixtos de células-Matrigel; cuando empezó a formarse un tumor, se midieron las longitudes del diámetro más largo y el diámetro más corto, y se calculó el volumen aproximado a un esferoide y se comparó. Los resultados se muestran en la FIG. 12.

45 Análisis

En tejido tumoral donde se había expresado de forma forzada SOX2, en comparación con el tejido tumoral donde no se había forzado la expresión del mismo, se observó marcada tumorigenicidad. Este resultado demuestra que cuando se expresa SOX2, aumenta la capacidad tumorigénica de la célula. Se cree que este mecanismo está relacionado con la transformación cancerosa de células IPS.

[Ejemplo 14]

Ejemplo experimental 14: estudio de tasa de supervivencia de pacientes con cáncer de mama SOX2-positivo (no de acuerdo con la invención)

Tejido tumoral primario de cáncer de mama se sometió a tinción inmunohistoquímica, y se clasificaron 201 casos de cáncer de mama en 40 casos de cáncer de mama SOX2-positivo y 161 casos de cáncer de mama SOX2-negativo. La FIG. 13 es un gráfico que muestra el cambio en el tiempo de la tasa de supervivencia en cada clasificación. Los pacientes con cáncer de mama SOX2-positivo tenían una tasa de supervivencia significativamente inferior en comparación con los pacientes con cáncer de mama SOX2-negativo.

[Ejemplo 15]

Ejemplo experimental 15: supresión de la expresión de SOX2 (no de acuerdo con la invención)

Se prepararon el plásmido sh-SOX2 y sh-EGFP a partir del vector RNAi-Ready pSIREN-RetroQ de acuerdo con el protocolo del vector insertando un oligonucleótido hibridado de las SEQ ID NO: 43, 44 para Sox2 y un oligonucleótido hibridado de las SEQ ID NO: 45, 46 para un control negativo como oligonucleótidos de ADNhc. Se transfectó la línea celular LHK2 con el plásmido sh-SOX2 y el plásmido sh-EGFP como control negativo y se cultivó en medio DMEM que contenía cisplatino a concentraciones de 0, 10, 30, y 100 μ M a 37 °C durante 24 horas. Después de esto, se midió la tasa de supervivencia celular por un método MTT. Los resultados se muestran en la FIG. 14.

Análisis

En las células transfectadas con sh-SOX2, la expresión del gen Sox2 estaba notablemente suprimida. Además, en comparación con células en que no se había suprimido la expresión del gen Sox2, las células en que estaba suprimida la expresión de Sox2 tenían una tasa de supervivencia significativamente inferior cuando se cultivaban en medio que contenía cisplatino. Esto demuestra que la supresión de la expresión del gen Sox2 potenciaba significativamente la sensibilidad de las células a cisplatino.

[Ejemplo 16]

Ejemplo experimental 16: ensayo de unión al péptido HLA-A24 del péptido derivado de Sox2

Se muestra la secuencia de aminoácidos de Sox2 en la SEQ ID NO: 62. Se sabe que un péptido que se une a HLA-A24 tiene tirosina, triptófano, fenilalanina, o metionina como el segundo aminoácido, y el aminoácido C-terminal es leucina, isoleucina, triptófano, fenilalanina, o metionina. Entre las secuencias contenidas en la secuencia de aminoácidos de Sox2, se seleccionaron las secuencias que tienen de 9 a 11 aminoácidos que tienen este motivo de unión a HLA-A24, y se sintetizaron los siguientes péptidos, un total de 13 tipos.

SOX2_1: MYNMMETEL (SEQ ID NO: 47)
 SOX2_50: VWSRGQRRKM (SEQ ID NO: 48)
 SOX2_58: KMAQENPKM (SEQ ID NO: 49)
 SOX2_89: PFIDEAKRL (SEQ ID NO: 50)
 SOX2_109: KYRPRRKTCTL (SEQ ID NO: 51)
 SOX2_119: LMKKDKYTL (SEQ ID NO: 52)
 SOX2_124: KYTLPGGLL (SEQ ID NO: 53)
 SOX2_165: GWSNGSYSM (SEQ ID NO: 54)
 SOX2_170: SYSMMQDQL (SEQ ID NO: 55)
 SOX2_196: PMHRYDVSAL (SEQ ID NO: 56)
 SOX2_209: SMTSSQTYM (SEQ ID NO: 57)
 SOX2_216: YMNGSPTYSM (SEQ ID NO: 58)
 SOX2_226: SYSQQGTPGM (SEQ ID NO: 59)

La célula T2-A24 es una línea celular en que se ha transferido el gen de HLA-A2402 a células T2 linfoblastoides y se ha expresado. Se expresa un bajo nivel de molécula HLA-A24 sobre la superficie celular de esta célula, y puede detectarse por un citómetro de flujo usando un anticuerpo monoclonal específico para HLA-A24. El nivel de expresión se cuantifica como una intensidad de fluorescencia media (MFI). Cuando se añade un péptido sintético a esta célula en un tubo de ensayo, si el péptido añadido se une a una molécula HLA-A24, el nivel de expresión de HLA-A24 en superficie celular aumenta en relación a la afinidad de unión. Usando este sistema experimental, se analizó la afinidad de unión a HLA-A24 de péptidos antígenicos de cáncer derivado de SOX2 de la presente divulgación.

Se cultivaron células T2-A24 a 26 °C durante una noche. Las células después se lavaron con PBS; se añadieron a las mismas el péptido sintético derivado de SOX2, como controles positivos, péptido de VIH (SEQ ID NO: 60), que es un péptido derivado del virus de la inmunodeficiencia humana y péptido de EBV (SEQ ID NO: 61), que es un péptido derivado del virus Epstein-Barr, y como control negativo, el péptido SL8 (SEQ ID NO: 63), que es un péptido derivado de ovalbúmina, y se co-cultivaron a 37 °C durante 3 horas. Después de co-cultivarse a una temperatura de 37 °C durante 2,5 horas adicionales, las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante, y se aislaron las células. Se añadió un anticuerpo anti-HLA-A24 (C7709A2.6) a las células aisladas, y la mezcla se dejó reposar a 4 °C durante 1 hora y después se lavó con PBS. Como anticuerpo secundario, se añadió un anticuerpo anti-IgG + IgM de ratón marcado con fluorescencia, se dejó que la mezcla reposara a 4 °C durante 30 minutos, y las células se fijaron añadiendo formalina al 1 %. Las células fijadas se sometieron a medición de intensidad de fluorescencia FITC por un citómetro de flujo (BD FACS Calibur).

Los resultados se muestran en la FIG. 15. Se determinó que ocho péptidos SOX2 que mostraban intensidad de fluorescencia a al menos el mismo nivel que o cercano al de los controles positivos eran péptidos de unión a HLA-A24.

[Ejemplo 17]

Ejemplo experimental 17: inducción de CTL (no de acuerdo con la invención)

Se centrifugaron 50 ml de sangre periférica de pacientes con cáncer pulmonar HLA-A24-positivo que dieron consentimiento informado y sujetos sanos HLA-A24-positivos en un gradiente de densidad de Ficoll-Conray, y se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se recogieron. Posteriormente, se separaron los linfocitos de PBMC en linfocitos CD8-positivos y linfocitos CD8-negativos usando perlas CD8 MACS.

En una placa de 96 pocillos, se mezclaron 200000 células/pocillo de linfocitos CD8-negativos y el péptido SOX2 de unión a HLA-A24 mencionado anteriormente, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas, y después se sometió a un grado de tratamiento de radiación con 100 Gy. Las células así tratadas se co-cultivaron con 20 U/ml de IL-2 (Takeda Pharmaceutical Company Limited.) y 100000 células/pocillo de linfocitos CD8-positivos, se realizó estimulación de los linfocitos CD8-positivos una vez a la semana para tres veces en total, y se indujeron CTL. Se evaluó la reactividad específica de péptido de los CTL inducidos por un ensayo de citotoxicidad o un ensayo ELISPOT.

[Ejemplo 18]

Ejemplo experimental 18: ensayo de citotoxicidad (no de acuerdo con la invención)

Se añadió Cr^{51} a células T2A24, las células se cultivaron en medio RPMI a 37 °C durante 1 hora, se radiomarcaron, y se lavaron con medio RPMI 4 veces. Se mezcló T2A24 marcado con Cr con péptido SOX2 o péptido de control (péptido de VIH), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se co-cultivaron 2000 células/pocillo de T2A24 pulsadas con péptido SOX2 o péptido de control y 14000 células/pocillo de linfocitos CD8⁺ inducidos en el Ejemplo 17 en medio RPMI a 37 °C durante 4 horas. Después se recogió el sobrenadante, y se midió la dosis de rayos-gamma usando un contador gamma.

La dosis cuando se cultivó solamente medio RPMI y T2A24 pulsadas con péptido se definió como liberación espontánea (SPR), la dosis cuando se cultivó el lisado celular (2 % de NP40) y T2A24 pulsadas con péptidos se definió como liberación máxima (MXR), y se calculó la citotoxicidad celular como (valor medido - SPR) / (MXR - SPR) x 100.

A partir de los resultados, se detectaron CTL que dañaban específicamente T2A24 pulsadas con péptidos SOX_109. Los resultados se muestran en la FIG. 16. Con el péptido derivado de VIH, que era el péptido de control, se detectó casi ninguna radiación debido a las células dañadas, mientras que se detectó fuerte radiación con péptido SOX2_109.

[Ejemplo 19]

Ejemplo experimental 19: ensayo ELISPOT (no de acuerdo con la invención)

Se realizó un experimento usando un sistema ELISPOT de IFN γ humano (BD). Se recubrió una placa ELISPOT con un anticuerpo anti-IFN γ dejándolo reposar a 4 °C durante una noche. Se añadieron por separado péptido SOX2 y un péptido de control (péptido de VIH) a T2A24, y las mezclas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se co-cultivaron 50000 células T2A24 pulsadas con péptido y 10000 CTL inducidos en el Ejemplo 2 en la placa recubierta con anticuerpo anti-IFN γ a 37 °C durante una noche. Después de lavar con PBS 1x y Tween 20 al 0,05 %, se añadió un anticuerpo anti-IFN γ marcado con biotina, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar con PBS 1x y Tween 20 al 0,05 %, se añadió estreptavidina marcada con HRP, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS 1x y Tween 20 al 0,05 %, se añadió un reactivo de color, y se contó la cantidad de manchas.

Los resultados se muestran en la FIG. 17. Se detectaron CTL que reaccionaron específicamente con T2A24 pulsadas con péptido SOX2_109. Se confirmó que, para el péptido derivado de VIH, que era un péptido de control, no se detectaba liberación de IFN γ a partir de las células T, pero para el péptido SOX2_109 se liberaba una gran cantidad de IFN γ .

[Ejemplo 20]

Ejemplo experimental 20: cambio en la tumorigenicidad por sobreexpresión de SMCP (no de acuerdo con la invención)

Se inocularon ratones NOD/SCID de forma subcutánea en la piel dorsal de la izquierda y la derecha con 10000 o 1000 células que expresan SMCP (células LHK2-SMCP) y células LHK2-simulado, y 100 μ l de mezcla de células-Matrigel; cuando empezó a formarse un tumor, se midieron las longitudes del diámetro más largo y el diámetro más corto, y se calculó el volumen aproximado a un esferoide y se comparó. Los resultados se muestran en la FIG. 18.

Análisis

En comparación con las células transfectadas de forma simulada, se formó rápidamente un tumor de tamaño grande para las células en que se sobreexpresaba SMCP. En particular, se mostró tumorigenicidad notablemente elevada incluso con una pequeña cantidad de células, y esto sugiere que SMCP es un gen relacionado con la tumorigenicidad de células madre cancerosas.

[Ejemplo 21]Ejemplo experimental 21: supresión de la expresión de SMCP (no de acuerdo con la invención)

Como ARNip, se usó ARNip Stealth Select RNAi(marca registrada) (n.º de catálogo 1299003) (Invitrogen). SMCP1 indica OligoID HSS142897, y SMCP3 indica OligoID HSS142899. Como control negativo, se usó Stealth RNA (marca registrada) siRNA Negative Control Hi GC (12935-400). Se mezclaron 100 pmol de ARNip y 4 µl de Lipofectamine RNAiMAX, se realizó cultivo en un fluido de cultivo DMEM a 37 °C durante 2 días, y se midió el nivel de expresión de ARNm por RT-PCR. Los resultados se muestran en la FIG. 19 a). Además, se midió el aumento en la cantidad de células desde 1 día hasta 4 días después de la transferencia génica. Los resultados se muestran en la FIG. 19 b). 2 días después de la transferencia génica, se inocularon los ratones NOD/SCID de forma subcutánea en la piel dorsal de la izquierda y la derecha con 200000 células transfectadas con SMCP1 (células LHK2-si-SMCP1) o células transfectadas con SMCP3 (células LHK2-si-SMCP3), y células transfectadas con control negativo (células LHK2-si-control), como 100 µl de una mezcla de células-Matrigel; cuando empezó a formarse un tumor, se midieron las longitudes del diámetro más largo y el diámetro más corto, y se calculó el volumen aproximado a un esferoide y se comparó. Los resultados se muestran en la FIG. 20.

Análisis

Las células en que se había suprimido la expresión del gen SMCP mostraron una disminución significativa en el potencial de proliferación celular y tumorigenicidad. Entre si-SMCP1 y si-SMCP3, que son diferentes en parte de la secuencia, existía una diferencia significativa en la disminución del potencial de proliferación y tumorigenicidad. Estos resultados sugieren la posibilidad de tratar el cáncer suprimiendo la expresión del gen SMCP.

[Ejemplo 22]Ejemplo experimental 22: RT-PCR de DNAJB8

DNAJB8 es un miembro de la familia DNAJ/HSP40 y es un gen que codifica una proteína de 26 kD, no ha habido informes detallados sobre su localización o función excepto que se expresa a alto nivel en testículo. Se cree que muchos de la familia DNAJ/HSP40 tienen un dominio J en el extremo N-terminal, y este dominio J se une a HSP70 para promover así la hidrólisis de ATP y para lograr un cambio en la estructura de una región de unión a sustrato HSP70, controlando de ese modo la actividad de HSP70. La propia HSP40 tiene una región de unión a péptido, y es una que tiene una función de entregar un péptido a HSP70.

Se usaron paneles de ADNc de múltiples tejidos humanos I, II (Clontech) como ADNc de tejido normal, y se extrajo el ARN de líneas celulares cancerosas cultivadas usando un kit RNeasy Mini (Qiagen). La línea celular cancerosa cultivada empleó líneas celulares de cáncer renal ACHN, Caki-1, SMKTR2, y SMKTR3, la línea celular de cáncer renal de ratón RenCa, las líneas celulares de cáncer de vejiga SW780, LB905-BLC, UM-UC3, y T24, las líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y LN-CaP, y la línea celular de cáncer de mama MCF7. Se purificó el ADNc a partir de 2 µg del ARN extraído usando una enzima de transcripción inversa Superscript III y un cebador oligo (dT) (Invitrogen). Se realizó PCR usando un total de 20 µl que contenía 0,25 µg de ADNc, 0,1 µg de ADN polimerasa Taq (Qiagen), y 12 pmol de cebador. Las condiciones de PCR emplearon las condiciones mostradas en la Tabla 2 del Ejemplo experimental 4 b) con 35 ciclos. Las secuencias de los cebadores para detectar DNAJB8 de ratón fueron TGACAGATGGAGAGCAGGTG (SEQ ID No: 64) y CCCTCATGAGCTTCTCCTTG (SEQ ID No: 65) para el cebador antisentido. El tamaño del producto de PCR fue de 408 pb para DNAJB8 humana y 463 pb para DNAJB8 de ratón. La secuencia de cebadores de G3PDH de control fue ACCACAGTCCATGCCATCAC (SEQ ID No: 66) y TCCACCACCTGTTGCTGTA (SEQ ID No: 67) como cebador antisentido, y el tamaño del producto de PCR fue de 452 pb.

Los resultados se muestran en la FIG. 21. Aparte de expresarse fuertemente en testículo, casi no se observó expresión de DNAJB8 en células normales humanas. Por otro lado, en las líneas celulares cancerosas cultivadas mencionada anteriormente, se observó expresión en todas las líneas celulares, aunque hubo algún grado de diferencia en el nivel de expresión.

[Ejemplo 23]Ejemplo experimental 23: análisis de citometría de flujo

Se cultivaron células ACHN, MCF7, y RenCa hasta una densidad del 80 %, y se realizó análisis por citometría de flujo del mismo modo que en el Ejemplo experimental 1. Los resultados se muestran en la FIG. 22.

Se aisló una fracción SP en los tres tipos de líneas celulares, y se confirmó que la expresión de DNAJB8 era más intensa que para una fracción MP.

[Ejemplo 24]

Ejemplo experimental 24: ensayo de tumorigenicidad

Se inocularon ratones Balb/c (hembra, 6 semanas) de forma subcutánea en la piel dorsal de la izquierda y la derecha con 10^4 , 10^3 , 10^2 , y 10^1 células RenCa por el mismo método que en el Ejemplo experimental 2, y se midió el tamaño del tumor cada semana. El volumen del tumor se calculó de forma aproximada como a continuación.

Volumen del tumor (mm^3) = diámetro más largo (mm) x diámetro más corto (mm^2) x 1/2.
Los resultados se muestran en la FIG. 23. Las células SP de RenCa mostraron fuerte tumorigenicidad en comparación con células MP o células antes de la separación celular.

[Ejemplo 25]

Ejemplo experimental 25: experimento de inmunoprolifaxis con vacuna de ADN

a) Preparación de plásmido de ADN

Se realizó clonación a partir de ADNc de RenCa para preparar el plásmido que expresaba DNAJB8 y Survivina, y se realizó inserción en el sitio de la enzima de restricción entre BamHI y XhoI del vector de expresión pcDNA3.1(+) (Invitrogen). En el lado 5' del antígeno, se insertó la secuencia señal 5'-ATGGAGACAGACACTCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGTTCCAGGTTCCACTGG TGAC-3' de cadena K de inmunoglobulina en el sitio de la enzima de restricción entre NheI y HindIII, y en el lado 3' del antígeno, se insertó la secuencia FLAG 5'-GATTACAAGGATGACGACGATAAG-3' en el sitio de la enzima de restricción entre XbaI y PmeI. Se amplificó el plásmido de ADN y se purificó usando el kit EndoFree Plasmid Giga (Qiagen), y se midió la concentración de ADN por la absorbancia a 260 nm.

b) Transferencia de Western

Se cultivaron células HEK293T hasta una densidad del 70 %. Se hizo transferencia génica del plásmido que contenía antígeno a células HEK293T usando FuGENE HD (Roche). Después de cultivar a 37 °C durante 48 horas, se recogió el sobrenadante de cultivo, se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 minutos, y se muestreó su sobrenadante. Se añadió DTT 0,1 M al sobrenadante en una cantidad del 10 % de la cantidad total, y se calentó a 100 °C durante 4 minutos.

Se separó la muestra por SDS-PAGE en un gel al 12 %, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se bloqueó la membrana, se añadió, a la misma, anticuerpo primario diluido 5000 veces, se realizó una reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se realizó una reacción usando anticuerpo secundario marcado con peroxidasa diluido 5000 veces a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se identificó el antígeno por quimioluminiscencia usando reactivos de detección de transferencia de Western ECL (Amersham).

Los resultados se muestran en la FIG. 24. La FIG. 24 a) muestra un mapa de construcción plasmídica, codificando la construcción plasmídica DNAJB8 secretada. Además, tiene una secuencia de marca FLAG en el extremo 3' terminal. La FIG. 24 b) muestra el resultado de transferencia de Western. Se descubrió de este modo que esta construcción plasmídica expresaba DNAJB8 secretada y Survivina.

c) Experimento de inmunoprolifaxis con vacuna

De inocularon 5 ratones balb/c (6 semanas, hembra) por grupo a través de la pata con 200 μg /animal de vacuna de plásmido de ADN para un total de 4 veces cada semana, y se inocularon por vía subcutánea en la piel dorsal con 10^5 /animal de RenCa 1 semana después de la fecha de inoculación final. Se midió el tamaño del tumor cada semana, examinando por tanto la inmunogenicidad de la vacuna de ADN.

Los resultados se muestran en la FIG. 25. Los ratones inmunizados con DNAJB8 mostraron un efecto significativamente mayor en la supresión del aumento del tumor que los ratones inmunizados con survivina.

[Ejemplo 26]

Ejemplo experimental 26: ensayo de unión a péptido por fragmento peptídico derivado de DNAJB8

Se predijeron por BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/), secuencias peptídicas antigénicas codificadas por DNAJB8 restringida a HLA-A24, y se prepararon 4 péptidos.

DNAJB8(22-30): AYRKLALRW (SEQ ID No: 68)
DNAJB8(90-99): GYTFRNPEDI (SEQ ID No: 69)
DNAJB8(99-107): IFREFFGGL (SEQ ID No: 70)
DNAJB8(143-151): AFMEAFSSF (SEQ ID No: 71)

Se usó la línea células T2A24 para la cual se había hecho la transferencia génica de HLA-A2402 a células T2 deficientes en transportador peptídico en un ensayo, y se realizó el experimento del mismo modo que en el Ejemplo experimental 16. En este Ejemplo experimental, se usó SL-8 como control negativo, y se usó survivina-2B (SEQ ID No: 72) como control positivo.

Los resultados se muestran en la FIG. 26. La FIG. 26 a) muestra la transición de fluorescencia, y la FIG. 26 b) muestra la intensidad de fluorescencia media. Entre los cuatro péptidos diseñados, tres mostraron unión a HLA-A24. [Ejemplo 27]

Ejemplo experimental 27: preparación de cepa de expresión constitutiva de DNAJB8

Se cultivó la línea celular de cáncer renal ACHN hasta el 70 %, y se hizo transferencia génica de un antígeno por un vector retroviral. Después de cultivar a 37 °C durante 48 horas, se añadió 1 µg/ml de puomicina, y se seleccionaron las células.

Los resultados se muestran en la FIG. 27. En una línea celular que expresaba DNAJB8 de forma constitutiva, la cantidad de células de la fracción SP aumentó significativamente.

[Ejemplo 28]

Ejemplo experimental 28: RT-PCR de OR7C1 (no de acuerdo con la invención)

El miembro 1 de la subfamilia C de la familia 7 de receptores olfativos (OR7C1) es una proteína de siete dominios transmembrana acoplada a proteína G clasificada como una familia de receptores olfativos a partir de su estructura. Aparte de un informe de expresión en la lengua, hasta ahora no se han detallado informes sobre un ligando del mismo, etc.

Se usaron los paneles de ADNc de tejidos múltiples humanos I, II (Clontech) como ADNc de tejido normal. Se extrajo el ARN de una línea celular cancerosa cultivada usando un kit RNeasy Mini (Qiagen). Como líneas celulares cancerosas cultivadas, se usaron las líneas celulares de cáncer colorrectal grande humano Sw480, HT29, HCT15, y KM12LM y la línea celular de cáncer pulmonar humano LHK2. Se purificó el ADNc a partir de 2 µg del ARN extraído usando la enzima de transcripción inversa Superscript III y cebador oligo (dT) (Invitrogen). Se realizó PCR usando un total de 20 µl que contenían 0,25 µg de ADNc, 0,1 µg de ADN polimerasa Taq (Qiagen), y 12 pmol de cebador. Las condiciones de PCR emplearon las condiciones mostradas en la Tabla 2 del Ejemplo experimental 4b) con 35 ciclos. El tamaño del producto de PCR fue 201 pb.

Los resultados se muestran en la FIG. 28. Entre las células normales maduras humanas y las células normales fetales humanas, fue solamente en testículo de células normales maduras humanas que se detectó OR7C1. Por otro lado, en la línea celular cancerosa cultivada SW480, se observó expresión particularmente fuerte en la fracción SP. En las células HT29, HCT15, KM12LM, y LHK2 también se observó fuerte expresión en la fracción SP.

[Ejemplo 29]

Ejemplo experimental 29: preparación de la cepa de expresión constitutiva de or7c1 y la línea de inactivación de or7c1 (no de acuerdo con la invención)

Se cultivaron células PLAT-A hasta una densidad de aproximadamente el 50 % en una placa de 10 cm con medio DMEM que contenía FBS al 10 % al que se había añadido 1 µg/ml de puomicina y 10 µg/ml de blasticidina. Se mezclaron 10 µg de vector retroviral pMXs-Ib que tenía or7c1 insertada en el mismo + 1000 µl de Opti-MEM (Invitrogen) y 40 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen) + 1000 µl de Opti-MEM incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos adicionales. Después de esto, se realizó mezcla con el medio celular PLAT-A mencionado anteriormente, se realizó el cultivo a 37 °C, 24 horas después de ello se realizó intercambio del medio con DMEM que contenía FBS al 10 %, y 24 horas después de ello se recogió el sobrenadante como un líquido de virus. Se cultivaron 1,5 ml de este líquido de virus y 8 µg/ml de polibreno en una placa de 6 pocillos a 37 °C junto con 2 x 10⁵ células Sw480, 8 horas después de ello se añadió 1 ml de DMEM que contenía FBS al 10 % reciente, y se realizó el cultivo a 37 °C. 48 horas después de ello se añadieron 2 µg/ml de puomicina, se seleccionaron las células, y se obtuvo una cepa de expresión constitutiva.

La preparación de ARNip se contrató a Invitrogen (OR7C1 Stealth Select 3 RNAi (HSS120191; HSS178215; HSS178216), Stealth RNAi Negative control kit). Se mezclaron 100 pmol de ARNip + 250 µl de Opti-MEM (Invitrogen) y 5 µl de lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) + 250 µl de Opti-MEM incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos adicionales. Después se

añadió a una placa de 6 pocillos con Sw480 cultivadas a una densidad del 20 %, se realizó el cultivo en DMEM que contenía FBS al 10 % a 37 °C, y se usaron las células después de 48 horas como una línea de inactivación de or7c1.

Se muestran imágenes de microscopia de contraste de fase y los resultados de RT-PCR de la cepa de expresión constitutiva de or7c1, la línea de inactivación de or7c1, y la línea celular Sw480 transfectada de forma simulada como una diana comparativa en la FIG. 29. Con respecto a la morfología celular, no hubo diferencias en las características entre las células Sw480 transfectadas de forma simulada y la cepa de expresión constitutiva, pero en la línea celular de inactivación se perdió la adhesión entre las células individuales. Se confirmó a partir del resultado de RT-PCR que or7c1 se expresaba fuertemente en la cepa de expresión constitutiva, pero apenas se expresaba en la línea de inactivación.

Se examinó el cambio en la fracción SP de la línea de inactivación de or7c1 del mismo modo que en el Ejemplo experimental 1. Los resultados se muestran en la FIG. 30. Las células SP desaparecieron en la línea celular de inactivación.

[Ejemplo 30]

Ejemplo experimental 30: ensayo de tumorigenicidad (no de acuerdo con la invención)

Se inocularon ratones NOD/SCID (hembra, de 5 semanas) de forma subcutánea en la piel dorsal de la izquierda y la derecha por el mismo método que en el Ejemplo experimental 2 con 10^4 , 10^3 , 10^2 , y 10^1 células tumorales (cepa de expresión constitutiva de or7c1 de la línea celular SW480) y células SW480 transfectadas de forma simulada como control negativo, y se midió el tamaño del tumor cada semana. Del mismo modo, se realizó inoculación de 10^7 células de inactivación de or7c1 y la línea de ARNip negativa como control negativo, y se midió el tamaño del tumor cada semana.

Los resultados se muestran en la FIG. 31. Comparando Sw480 transfectada de forma simulada y la cepa de expresión constitutiva de or7c1, no hubo diferencia notable para 10^4 y 10^3 , pero para 10^2 y 10^1 la tumorigenicidad fue mayor para la cepa de expresión constitutiva. Con respecto al ARNip negativo y la línea de inactivación de or7c1, para 10^4 la línea de inactivación de or7c1 mostró tumorigenicidad notablemente baja.

[Ejemplo 31]

Ejemplo experimental 31: ensayo de unión a péptido por el fragmento peptídico derivado de or7c1 (no de acuerdo con la invención)

Los siguientes péptidos se prepararon del mismo modo que en el Ejemplo experimental 26, y se realizó un ensayo de unión.

or7c1_34(10): MYLVTFTGNL (SEQ ID NO: 73)
 or7c1_59(10): MYFFISNLSF (SEQ ID NO: 74)
 or7c1_93(10): TYAGCLSQIF (SEQ ID NO: 75)
 or7c1_131(10): HYTViMNPQL (SEQ ID NO: 76)
 or7c1_217(10): SYyKiVFSIL (SEQ ID NO: 77)
 or7c1_251(10): FYGTGFGVYL (SEQ ID NO: 78)
 or7c1_277(9): MYTMVTPML (SEQ ID NO: 79)

Los resultados se muestran en la FIG. 32. A partir de estos resultados, se observó unión a HLA-A2402 para 277(9), 34(10), 251(10), 131(10), y 93(10).

[Ejemplo 32]

Ejemplo experimental 32: inducción de CTL

Se separó PBMC de sangre completa (heparina añadida) muestreada de un sujeto de ensayo usando Lymphoprep (Nycomed). Después de cultivar las PBMC a 37 °C durante 24 horas, se realizó un experimento usando células no adherentes. Para obtener células CD8-positivas a partir de las células no adherentes, se separaron las células CD8-positivas y negativas usando un sistema magnético de separación celular (Miltenyi Biotec). Para células CD-negativas, se añadieron 100 U/ml de IL-2 y 1 µg/ml de PHA-P a medio AIM-V (Life Technologies) para dar PHA-blastos. Se cultivaron las células CD8-positivas en medio AIM-V a 37 °C y se estimularon con 1/5 la cantidad de PHA-blastos tres veces cada 7 días (0 día, 7° día, 14° día). Desde el 8° día, se añadieron 50 U/ml de IL-2 al medio, y

después de ello cada 3 a 4 días se intercambió el medio, y se añadieron 50 U/ml de IL-2. Las células se sometieron como CTL a ELISPOT en el 21^{er} día y a un ensayo de liberación de ⁵¹Cr en el 28^o día.

[Ejemplo 33]

Ejemplo experimental 33: ensayo ELISPOT

Para realizar ELISPOT, se usaron 5 x 10⁵/ml de los CTL inducidos mencionados anteriormente como células efectoras. Se usaron células T2A24 y K562 (siendo K562 un control negativo) como diana. Durante dos horas se incubaron células T2A24 a temperatura ambiente, usando 5 µg/ml de cada uno de los péptidos que se habían encontrado por el ensayo de unión a péptido, mencionado anteriormente, para presentarse en HLA-A24. Las células diana se ajustaron a 5x10⁵/ml. Se añadieron 100 µl/pocillo de 5 µg/ml de anticuerpo de captura de IFN-γ (PharMingen) a una placa multitamiz de 96 pocillos (Millipore), y se sumergió en PBS a 4 °C y se dejó reposar durante una noche. Las células después se lavaron una vez con 200 µl/pocillo de RPMI1640 (Sigma Chemical Co), y se fijaron con RPMI1640 durante 2 horas. Se añadieron 100 µl de cada una de las células efectoras/diana mencionadas anteriormente a los pocillos, se incubaron durante 40 horas, se retiraron las células por lavado, y después se añadió un anticuerpo contra citoquina para la detección. Además, se añadió enzima marcada con estreptavidina y se realizó el recuento usando un lector ELISPOT.

Los resultados se muestran en la FIG. 33. En el péptido 93(10), se confirmó la liberación de IFN-γ.

[Ejemplo 34]

Ejemplo experimental 34: ensayo de liberación de ⁵¹Cr

En un ensayo para medir la citotoxicidad celular, se marcaron las células con ⁵¹Cr radiactivo, y se midió la citotoxicidad celular por CTL. Se usaron CTL como células efectoras, y T2A24, K562, Sw480, y Sw480 que expresaba de forma constitutiva or7c1 se usaron como células diana. En primer lugar, se recogieron 1 x 10⁶ células diana, se añadieron de 10 a 100 µl de ⁵¹Cr, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora, marcando de ese modo las células con ⁵¹Cr. Las células marcadas se lavaron con RPMI1640 cuatro veces, y se disolvieron en RPMI1640 para dar 1 x 10⁵/ml (finalmente usadas a 2000 células diana/pocillo). Se pulsó T2A24 con 5 µg/ml de péptido, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Por otro lado, se sembraron los CTL en una placa de 96 pocillos por disolución con 100 µl de AIM-V de acuerdo con las relaciones E/T respectivas. Para el análisis de los datos, se colocaron 100 µl de AIM-V en un pocillo para medir la liberación espontánea y 100 µl de NP-40 al 2 % en un pocillo para medir la liberación máxima por anticipado en los pocillos. Se añadieron 100 µl de cada una de las células diana a los pocillos de una placa de 96 pocillos que contenía el efector, y se cultivó a 37 °C durante 4 horas. Después se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se sometieron a medición usando un contador gamma. El análisis empleó la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de eliminación} = (\text{liberación medida} - \text{liberación espontánea}) \times 100 / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$$

Los resultados se muestran en la FIG. 34. En comparación con Sw480, la citotoxicidad celular fue mayor para Sw480 que expresaba de forma constitutiva or7c1. Con respecto a T2A24, para relaciones E/T de 20 y 6, una pulsada con péptido 93(10) mostró mayor citotoxicidad celular.

Aplicabilidad industrial

El marcador molecular proporcionado por la presente invención para su uso en un método de determinación habitualmente se expresa poco en células normales adultas, pero se expresa en muchas células madre cancerosas, y posibilita un diagnóstico de precisión mucho mayor que las técnicas de diagnóstico de cáncer convencionales reconociendo específicamente solo células tumorales en el organismo o el tejido. Además, como reconoce específicamente células madre cancerosas en particular, se espera que contribuya ampliamente a la industria médica, tal como en el desarrollo de inmunoterapia contra el cáncer, terapia contra dianas moleculares, terapia de transferencia génica, etc.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Japan Science and Technology Agency Sapporo Medical University

<120> Marcadores moleculares para células madre cancerosas

<130> 2378SI

<160> 79

<170> PatentIn versión 3.1

5 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo para SRY (Región Y determinante del sexo) de *Homo sapiens*-caja 2, ARNm

10 <400> 1
actttgtcg gagacggaga 20

15 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador inverso para SRY (Región Y determinante del sexo) de *Homo sapiens*-caja 2, ARNm
<400> 2
gttcattgtgc gcgtaactgt 20

25 <210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador directo para proteína rica en cisteína asociada a mitocondrias de esperma de *Homo sapiens*, ARNm
<400> 3
tgtgtgacca gacaaaacac ag 22

35 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> cebador inverso para proteína rica en cisteína asociada a mitocondrias de esperma de *Homo sapiens*, ARNm

45 <400> 4
gttgggctca gactccatgt 20

50 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> cebador directo para la subunidad 1 del complejo integrador de *Homo sapiens*, ARNm
<400> 5
tgtccagcat gagcaaactc 20

60 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

65 <220>
<223> cebador inverso para subunidad 1 del complejo integrador de *Homo sapiens*, ARNm

ES 2 805 553 T3

	<400> 6		
	aaaccgtagc agggtcacac	20	
5	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> cebador directo para proteína 19 de dedo de zinc de <i>Homo sapiens</i> , ARNm		
	<400> 7		
	atgtggaaaa gcaccaggac	20	
15	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> cebador inverso para proteína 19 de dedo de zinc de <i>Homo sapiens</i> , ARNm		
	<400> 8		
	tcctctgggtg ccgaattaac	20	
25	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> cebador directo para inhibidor de la familia Myo-D de <i>Homo sapiens</i> , ARNm		
	<400> 9		
35	caggaagact gctgtgtcca	20	
40	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> cebador inverso para inhibidor de la familia Myo-D de <i>Homo sapiens</i> , ARNm		
45	<400> 10		
	atgcagatct ccaggcagtc	20	
50	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> cebador directo para ADNc FLJ13464 de <i>Homo sapiens</i>		
55	<400> 11		
	tgcataacac caaaggtcca	20	
60	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
65	<220> <223> cebador inverso para ADNc FLJ13464 de <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 12		

ES 2 805 553 T3

	gacctggcca atacaatgct	20
5	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para ADNc DKFZp667J237 de <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13 aggacatgcc tgggtgatag	20
15	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para ADNc DKFZp667J237 de <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14 cccaatcctg agttcttcca	20
25	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para surfeit 6 de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	
	<400> 15 cgactgcatg agaagatcca	20
35	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador inverso para surfeit 6 de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	
45	<400> 16 gaggaggtg gtccacttca	20
50	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo para protocadherina 19 de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	
55	<400> 17 cccaaggtca acagcgttat	20
60	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para protocadherina 19 de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	
	<400> 18 cacaccaggg gactctttgt	20

ES 2 805 553 T3

5 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo para dachsous 2 (Drosophila) de *Homo sapiens*, variante de transcrito 1, ARNm
 10 <400> 19
 gaaggagatc aaggggaagg 20
 <210> 20
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para dachsous 2 (Drosophila) de *Homo sapiens*, variante de transcrito 1, ARNm
 20 <400> 20
 atcaaagggg gtggaaaac 20
 <210> 21
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> cebador directo para protocadherina 21 de *Homo sapiens*, ARNm
 <400> 21
 atgcagagga acccaacaac 20
 35 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> cebador inverso para protocadherina 21 de *Homo sapiens*, ARNm
 <400> 22
 45 tgagtaaggc tgtgtgtctg 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador directo para galactosa-3-O-sulfotransferasa 1 de *Homo sapiens*, ARNm
 <400> 23
 55 ggctgtctc aacatcatct 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para galactosa-3-O-sulfotransferasa 1 de *Homo sapiens*, ARNm
 65 <400> 24
 gctgtgtca tagccaggt 20

5
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo para familia 11 similar a ras de *Homo sapiens*, miembro B, ARNm

10
 <400> 25
 tgtggtgatc gtttctcca 20

15
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para la familia 11 similar a ras de *Homo sapiens* miembro B, ARNm

20
 <400> 26
 agggagggtc ttcgctctc 20

25
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo para hirsuto y potenciador de la división 6 (*Drosophila*) de *Homo sapiens*, ARNm

30
 <400> 27
 agctcctgaa ccatctgctc 20

35
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para hirsuto y potenciador de la división 6 (*Drosophila*) de *Homo sapiens*, ARNm

40
 <400> 28
 agcaggagcc tgactcagtt 20

45
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo para la proteína 415 de dedo de zinc de *Homo sapiens*, ARNm

50
 <400> 29
 cttgcaaggc attggagaat 20

55
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para la proteína 415 de dedo de zinc de *Homo sapiens*, ARNm

60
 <400> 30
 taggcttgaa tgcacactga 20

65

5 <210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador directo para el factor relacionado con la transcripción de NK2 de *Homo sapiens*, locus 5 (Drosophila), ARNm

15 <400> 31
acgcccttct cagtcaaaga 20

20 <210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador inverso para el factor relacionado con la transcripción de NK2 de *Homo sapiens*, locus 5 (Drosophila), ARNm

25 <400> 32
ttttcggctc tagggtcctt 20

30 <210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> cebador directo para interaccionador COOH-terminal de peptidilglicina alfa-amidante monooxigenasa de *Homo sapiens*, ARNm

40 <400> 33
tgatcatttc ccaggacat 20

45 <210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> cebador inverso para interaccionador COOH-terminal de peptidilglicina alfa-amidante monooxigenasa de *Homo sapiens*, ARNm

55 <400> 34
cccttcgca tcttcattta 20

60 <210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

65 <220>
<223> cebador directo para feniletanolamina N-metiltransferasa de *Homo sapiens*, ARNm

<400> 35
gaatgctggc aggataagga 20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso para feniletanolamina N-metiltransferasa de *Homo sapiens*, ARNm

	<400> 36 ctttagcca ctacgcacca	20
5	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para secretoglobina de <i>Homo sapiens</i> , familia 3A, miembro 1, ARNm	
15	<400> 37 ctccgctgct gcttcttag	20
20	<210> 38 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para secretoglobina de <i>Homo sapiens</i> , familia 3A, miembro 1, ARNm	
25	<400> 38 ccagctcagc cacacactt	19
30	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo para receptor olfativo de <i>Homo sapiens</i> , familia 7, subfamilia C, miembro 1, ARNm	
35	<400> 39 agctctgtgg actgctggtt	20
40	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador inverso para receptor olfativo de <i>Homo sapiens</i> , familia 7, subfamilia C, miembro 1, ARNm	
50	<400> 40 ggacgccagt tgcaaagtat	20
55	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para homólogo de ADNj de <i>Homo sapiens</i> , subfamilia B, miembro 8, ARNm	
60	<400> 41 ccgacaagaa ccctgacaat	20
65	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para homólogo de ADNj de <i>Homo sapiens</i> , subfamilia B, miembro 8, ARNm	

ES 2 805 553 T3

	<400> 42 aggtggatga gaaggtggtg	20	
5	<210> 43 <211> 65 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> oligonucleótido de ADNhc para Sox2		
	<400> 43		
	gatccgccag ctgcgagacc tacatttcaa gagaatgtag gtctgcgagc tggttttttc	60	
15	tagag	65	
20	<210> 44 <211> 65 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> oligonucleótido de ADNhc para Sox2		
25	<400> 44		
	aattctctag aaaaaaccag ctgcgagacc tacattctct tgaaatgtag gtctgcgagc	60	
	tggcg	65	
30	<210> 45 <211> 65 <212> ADN <213> Artificial		
35	<220> <223> oligonucleótido de ADNhc para EGFP <400> 45		
	gatccgcaac agccacaacg tctatttcaa gagaatagac gttgtggctg ttgttttttc	60	
	tagag	65	
40	<210> 46 <211> 65 <212> ADN <213> Artificial		
45	<220> <223> oligonucleótido de ADNhc para EGFP		
	<400> 46		
	aattctctag aaaaaacaac agccacaacg tctattctct tgaaatagac gttgtggctg	60	
50	ttgcg	65	
	<210> 47 <211> 9 <212> PRT		

	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> fragmento peptídico de SOX2	
	<400> 47	
		Met Tyr Asn Met Met Glu Thr Glu Leu 1 5
10	<210> 48	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> fragmento peptídico de SOX2	
	<400> 48	
		Val Trp Ser Arg Gly Gln Arg Arg Lys Met 1 5 10
20	<210> 49	
	<211> 9	
	<212> PRT	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> fragmento peptídico de SOX2	
30	<400> 49	
		Lys Met Ala Gln Glu Asn Pro Lys Met 1 5
35	<210> 50	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> fragmento peptídico de SOX2	
	<400> 50	
		Pro Phe Ile Asp Glu Ala Lys Arg Leu 1 5
45	<210> 51	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> fragmento peptídico de SOX2	
	<400> 51	
55		Lys Tyr Arg Pro Arg Arg Lys Thr Lys Thr Leu 1 5 10

5	<210> 52 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> fragmento peptídico de SOX2
10	<400> 52 Leu Met Lys Lys Asp Lys Tyr Thr Leu 1 5
15	<210> 53 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> fragmento peptídico de SOX2
20	<400> 53 Lys Tyr Thr Leu Pro Gly Gly Leu Leu 1 5
25	<210> 54 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> fragmento peptídico de SOX2
30	<400> 54 Gly Trp Ser Asn Gly Ser Tyr Ser Met 1 5
35	<210> 55 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> fragmento peptídico de SOX2
40	<400> 55 Ser Tyr Ser Met Met Gln Asp Gln Leu 1 5
45	<210> 56 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> fragmento peptídico de SOX2
50	<400> 56
55	<210> 57 <211> 11 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> fragmento peptídico de SOX2

<400> 56

Pro Met His Arg Tyr Asp Val Ser Ala Leu
1 5 10

5 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> fragmento peptídico de SOX2

<400> 57

Ser Met Thr Ser Ser Gln Thr Tyr Met
1 5

15 <210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> fragmento peptídico de SOX2

25 <400> 58

Tyr Met Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Ser Met
1 5 10

30 <210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> fragmento peptídico de SOX2

<400> 59

Ser Tyr Ser Gln Gln Gly Thr Pro Gly Met

1 5 10

40 <210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> epítipo de unión HLA-A24 de VIH

<400> 60

50 **Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile**
1 5 10

ES 2 805 553 T3

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> epítopo de unión HLA-A24 de VEB

10

<400> 61

Thr Tyr Gly Pro Val Phe Met Ser Leu
 1 5

15

<210> 62
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 62

Met Tyr Asn Met Met Glu Thr Glu Leu Lys Pro Pro Gly Pro Gln Gln
 1 5 10 15

Thr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly
 20 25 30

Asn Gln Lys Asn Ser Pro Asp Arg Val Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe
 35 40 45

Met Val Trp Ser Arg Gly Gln Arg Arg Lys Met Ala Gln Glu Asn Pro
 50 55 60

Lys Met His Asn Ser Glu Ile Ser Lys Arg Leu Gly Ala Glu Trp Lys
 65 70 75 80

Leu Leu Ser Glu Thr Glu Lys Arg Pro Phe Ile Asp Glu Ala Lys Arg
 85 90 95

Leu Arg Ala Leu His Met Lys Glu His Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg Pro
 100 105 110

20

Arg Arg Lys Thr Lys Thr Leu Met Lys Lys Asp Lys Tyr Thr Leu Pro
115 120 125

Gly Gly Leu Leu Ala Pro Gly Gly Asn Ser Met Ala Ser Gly Val Gly
130 135 140

Val Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Val Asn Gln Arg Met Asp Ser Tyr
145 150 155 160

Ala His Met Asn Gly Trp Ser Asn Gly Ser Tyr Ser Met Met Gln Asp
165 170 175

Gln Leu Gly Tyr Pro Gln His Pro Gly Leu Asn Ala His Gly Ala Ala
180 185 190

Gln Met Gln Pro Met His Arg Tyr Asp Val Ser Ala Leu Gln Tyr Asn
195 200 205

Ser Met Thr Ser Ser Gln Thr Tyr Met Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Ser
210 215 220

Met Ser Tyr Ser Gln Gln Gly Thr Pro Gly Met Ala Leu Gly Ser Met
225 230 235 240

Gly Ser Val Val Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ser Pro Pro Val Val Thr
245 250 255

Ser Ser Ser His Ser Arg Ala Pro Cys Gln Ala Gly Asp Leu Arg Asp
260 265 270

Met Ile Ser Met Tyr Leu Pro Gly Ala Glu Val Pro Glu Pro Ala Ala
275 280 285

Pro Ser Arg Leu His Met Ser Gln His Tyr Gln Ser Gly Pro Val Pro
290 295 300

Gly Thr Ala Ile Asn Gly Thr Leu Pro Leu Ser His Met
305 310 315

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo de OVA

<400> 63

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

5 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador directo para ADNJB8 de ratón

<400> 64
 tgacagatgg agagcaggtg 20

15 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso para ADNJB8 de ratón

<400> 65
 ccctcatgag cttctccttg 20

25 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador directo para G3PDH

<400> 66
 accacagtcc atgccatcac 20

35 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador inverso para G3PDH

<400> 67
 tccaccaccc tgttgctgta 20

45 <210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> fragmento peptídico de ADNJB8

55 <400> 68

Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Arg Trp
1 5

60 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> fragmento peptídico de ADNJB8

<400> 69

5

Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Pro Glu Asp Ile
1 5 10

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> fragmento peptídico de ADNJB8

15

<400> 70

Ile Phe Arg Glu Phe Phe Gly Gly Leu
1 5

20

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> fragmento peptídico de ADNJB8

<400> 71

Ala Phe Met Glu Ala Phe Ser Ser Phe
1 5

30

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> fragmento peptídico de survivina

40

<400> 72

Ala Tyr Ala Cys Asn Thr Ser Thr Leu
1 5

45

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> fragmento peptídico de OR7C1

<400> 73

Met Tyr Leu Val Thr Phe Thr Gly Asn Leu
1 5 10

55

<210> 74

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> fragmento peptídico de OR7C1
 <400> 74
 Met Tyr Phe Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe
 10 1 5 10
 <210> 75
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> fragmento peptídico de OR7C1
 20 <400> 75
 Thr Tyr Ala Gly Cys Leu Ser Gln Ile Phe
 1 5 10
 <210> 76
 25 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> fragmento peptídico de OR7C1
 <400> 76
 His Tyr Thr Val Ile Met Asn Pro Gln Leu
 1 5 10
 35 <210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> fragmento peptídico de OR7C1
 <400> 77
 45 Ser Tyr Tyr Lys Ile Val Phe Ser Ile Leu
 1 5 10
 <210> 78
 <211> 10
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> fragmento peptídico de OR7C1
 55 <400> 78

Phe Tyr Gly Thr Gly Phe Gly Val Tyr Leu
1 5 10

5 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

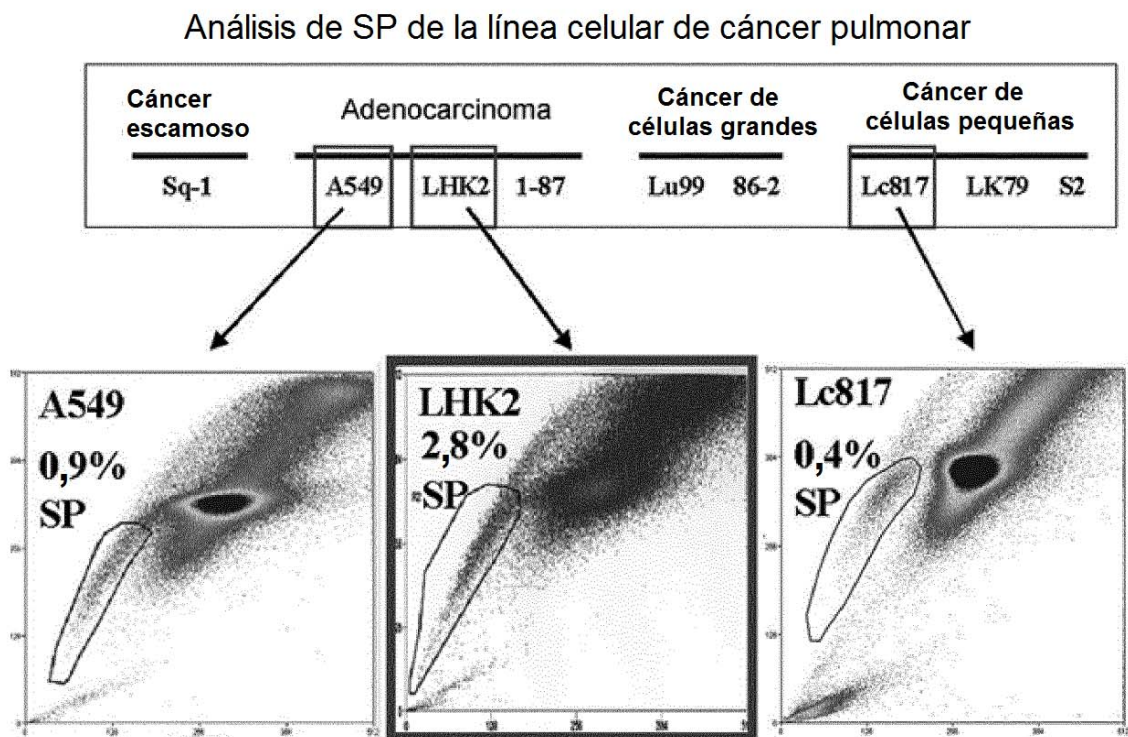
10 <220>
 <223> fragmento peptídico de OR7C1
 <400> 79

Met Tyr Thr Met Val Thr Pro Met Leu
1 5

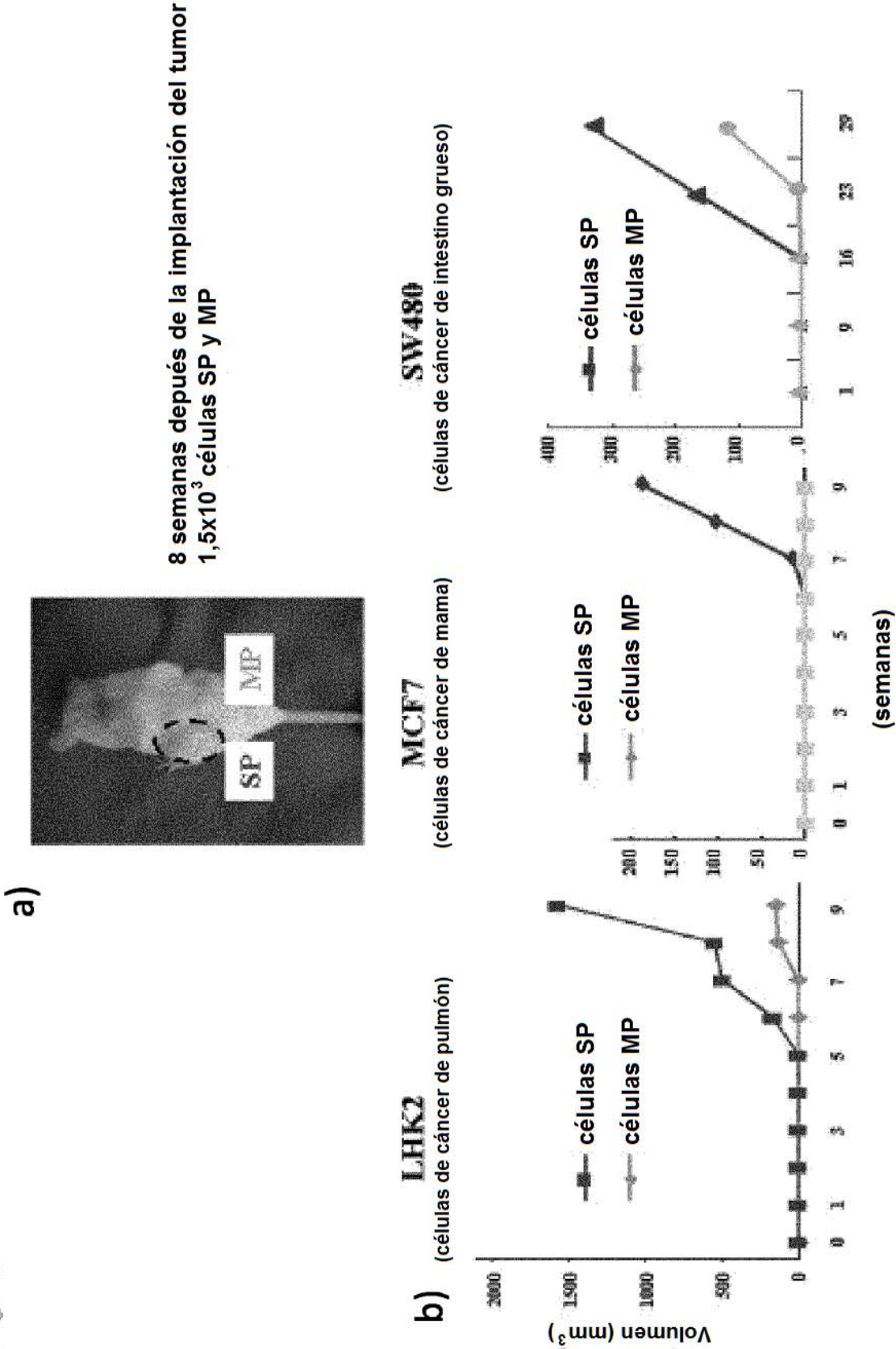
REIVINDICACIONES

1. Un péptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - 5 DNAJB8(143-151): AFMEAFSSF (SEQ ID NO: 71);
DNAJB8(22-30): AYRKLALRW (SEQ ID NO: 68); y
DNAJB8(99-107): IFREFFGGL (SEQ ID NO: 70).
2. Un ácido nucleico que codifica DNAJB8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 10 3. Un producto de expresión de un gen de DNAJB8 para su uso en la detección de células madre cancerosas *in vivo*.
- 15 4. Un método *in vitro* para detectar células madre cancerosas en una diana de detección, detectando la presencia de un producto de expresión de DNAJB8, en el que la diana de detección es una o más poblaciones celulares derivadas de células o tejido seleccionadas del grupo que consiste en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, leucocitos, estómago, médula ósea, intestino grueso y células mononucleares de sangre periférica.
- 20 5. Un uso de un kit que comprende un reactivo para detectar al menos el producto de expresión de un gen de DNAJB8, en la determinación de la presencia o ausencia de células madre cancerosas *in vitro*.
- 25 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el reactivo para la detección es una sonda y/o un cebador para detectar ARNm que es un producto de expresión de un gen de DNAJB8, en el que la sonda y/o el cebador comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al gen.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el reactivo para la detección es un anticuerpo para detectar un polipéptido que es un producto de expresión de un gen de DNAJB8.

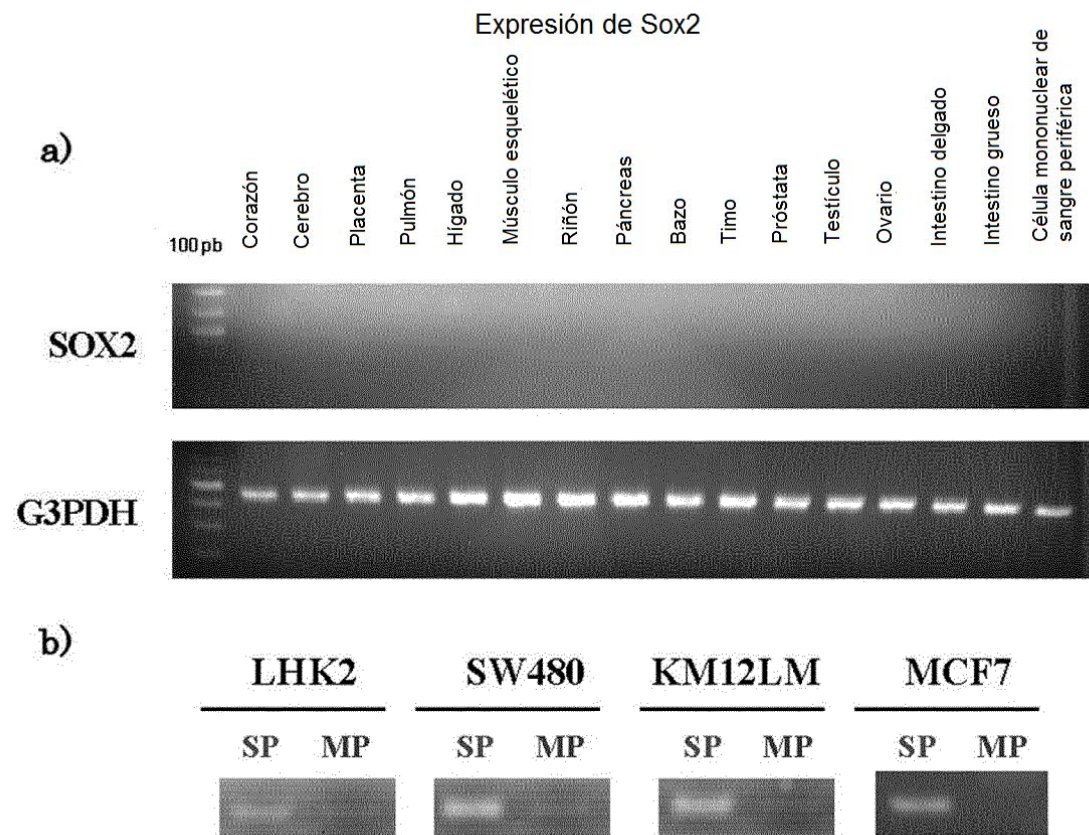
[Fig. 1]



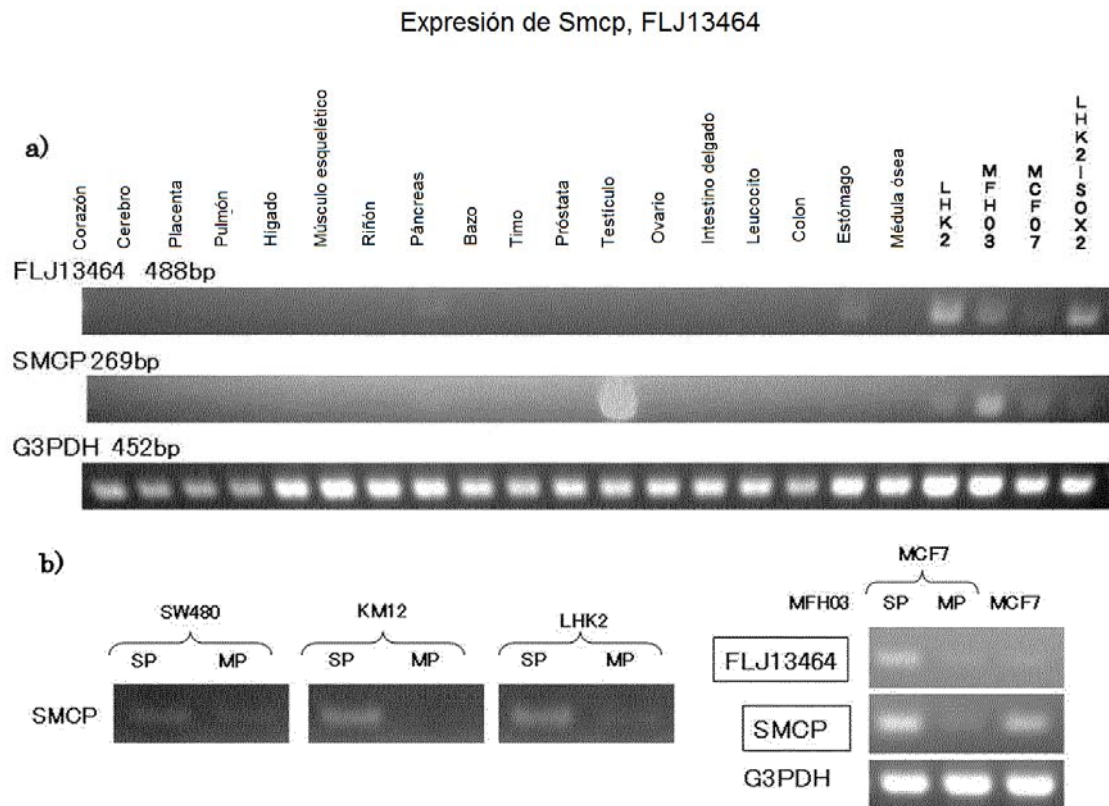
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]

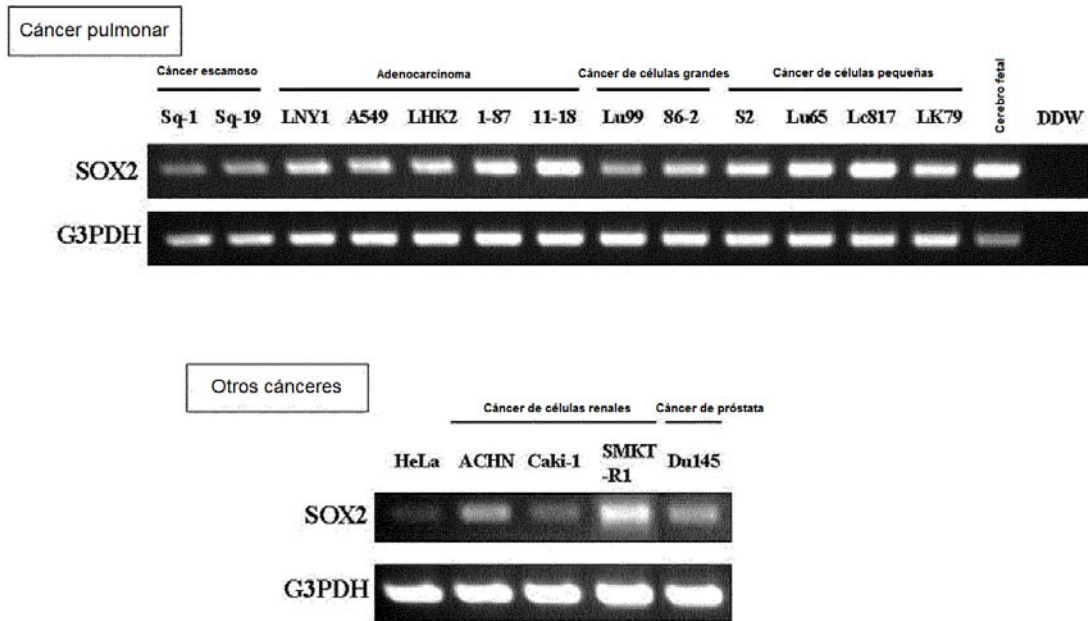
Diagrama de expresión génica

	Corazón	Cerebro	Placenta	Pulmón	Hígado	Músculo esquelético	Riñón	Páncreas	Bazo	Timo	Próstata	Testículo	Ovario	Intestino delgado	Intestino grueso/colon	Estómago	Médula ósea	Leucocitos monocitocitos de sangre periférica	LHK2	MFH03	MCF7	LHK2-SOX2	SW480	KM12
Sox2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Smcp	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ints1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Kox12 (Znf19)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mdf1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
FLJ13464	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
667J237	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Surf6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pcdh19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Dchs2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pcdh21	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Gal3st1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ras11b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Hes6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Znf415	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nkx2-5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pamci (Rassf9)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Prmt	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Scgb3a1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Or7c1 (Tocr86)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DNAJB8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

En el diagrama, O denota positivo, Δ denota falso positivo, y X denota negativo.

[Fig. 6]

Expresión de ARNm de Sox2 en líneas celulares cancerosas

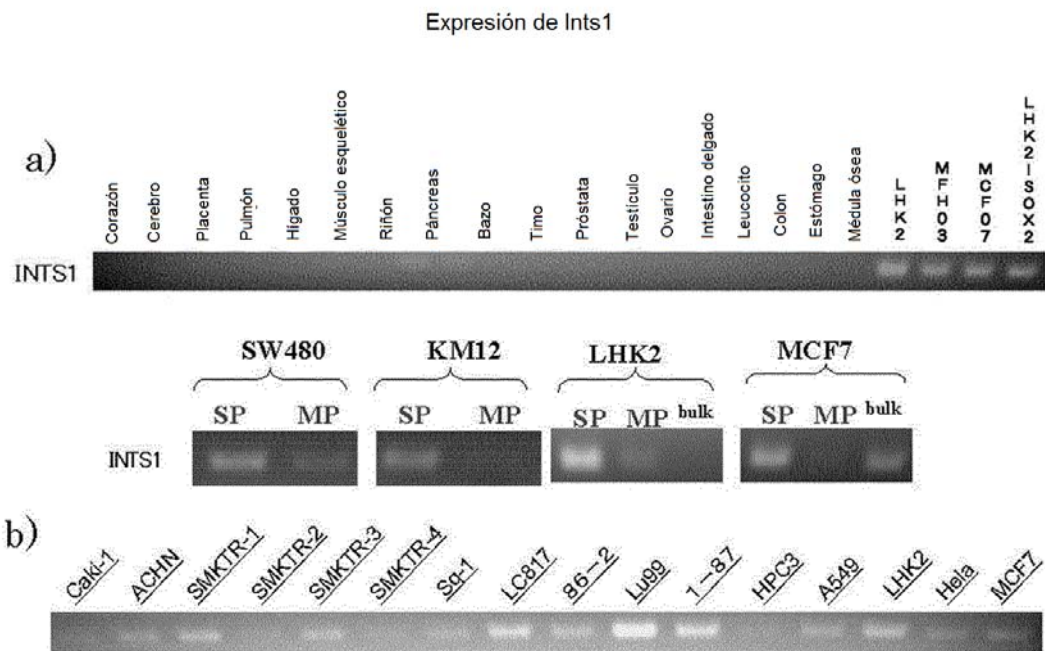


[Fig. 7]

Expresión de Smcp en línea celular cancerosa



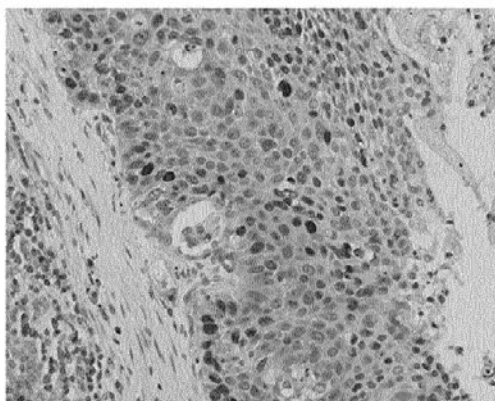
[Fig. 8]



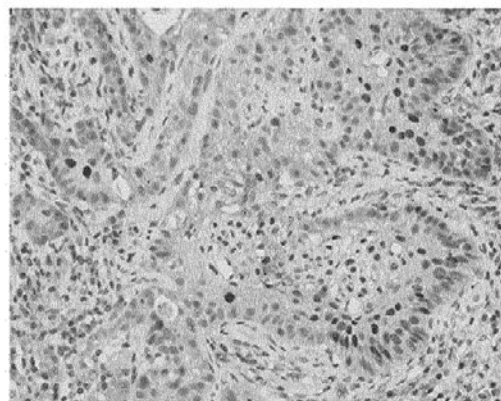
[Fig. 9]

Expresión de antígeno SOX2 de células madre cancerosas en cáncer pulmonar
(tinción inmunohistoquímica)

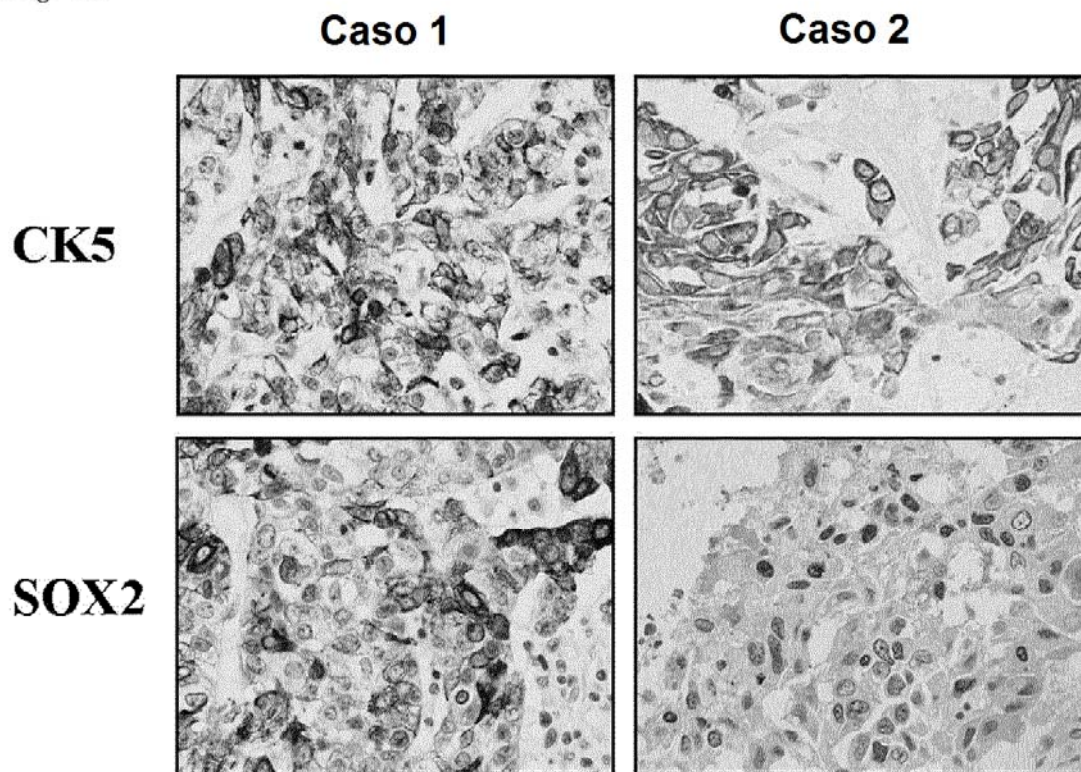
Caso 1



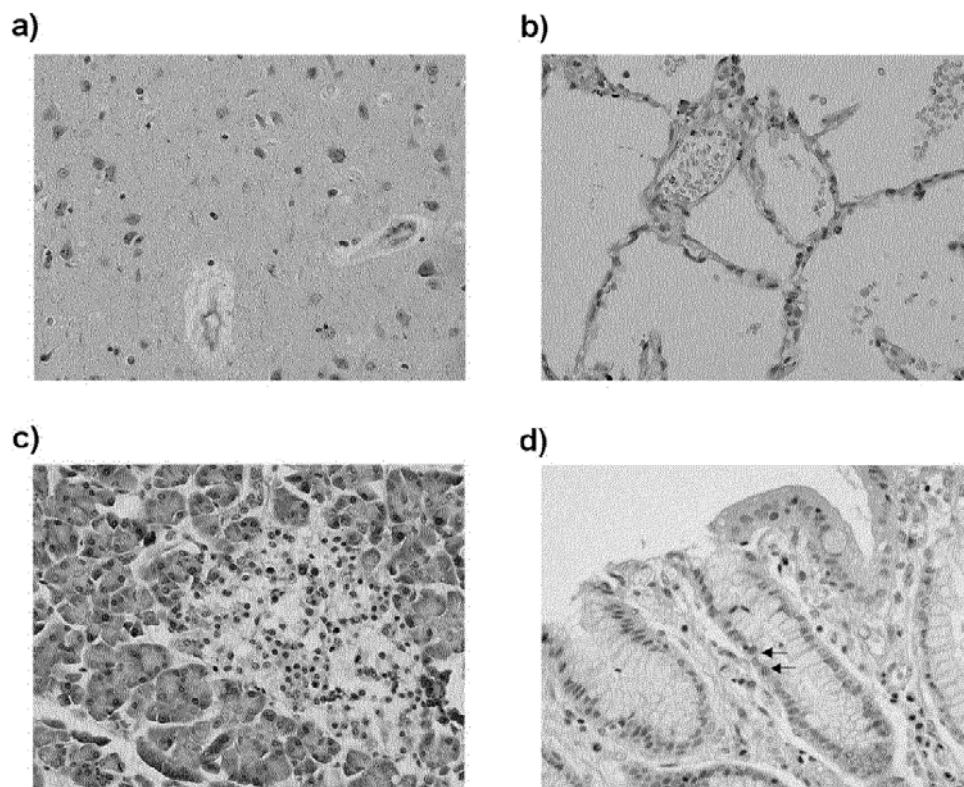
Caso 2



[Fig. 10]

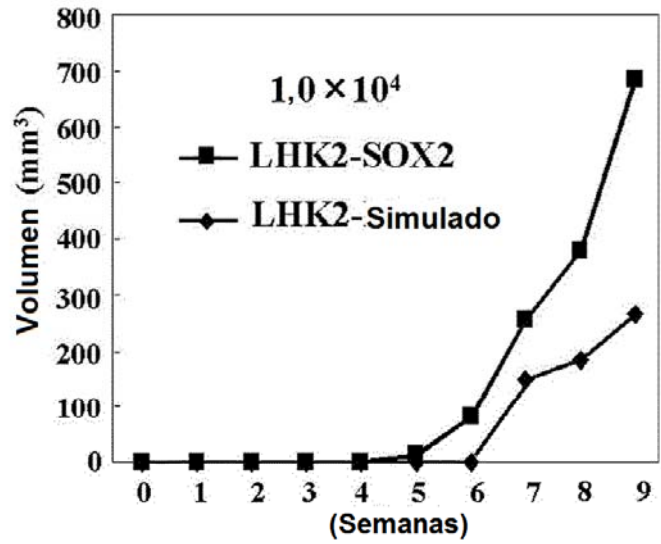
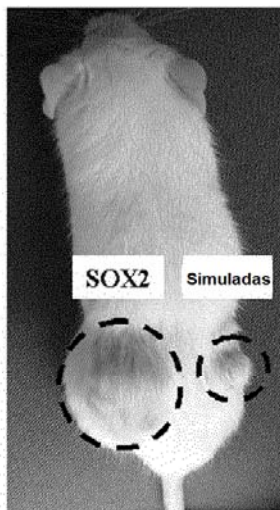


[Fig. 11]

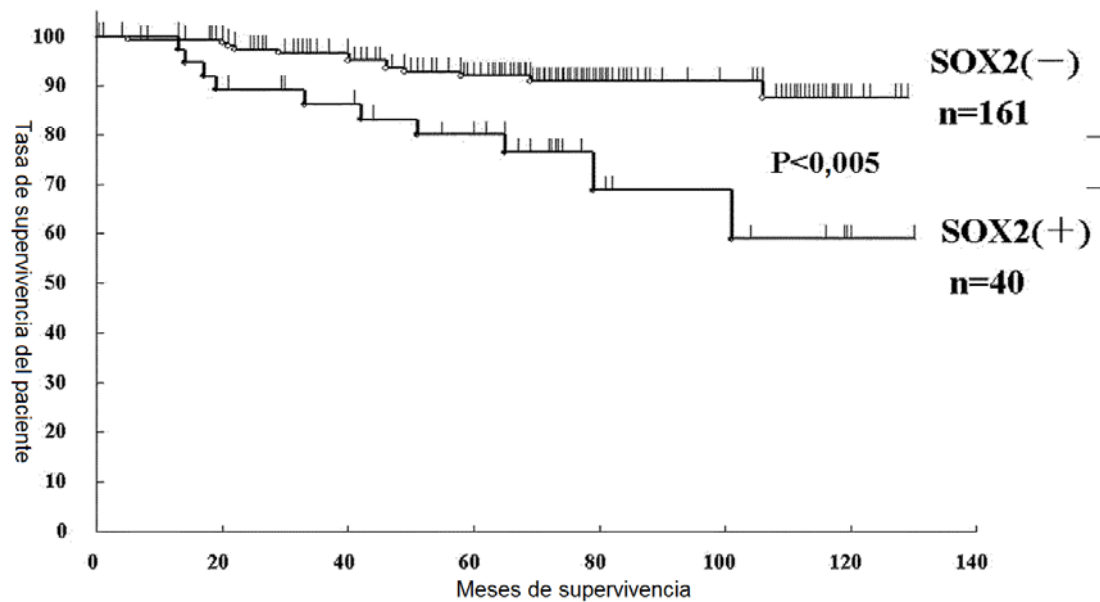


[Fig. 12]

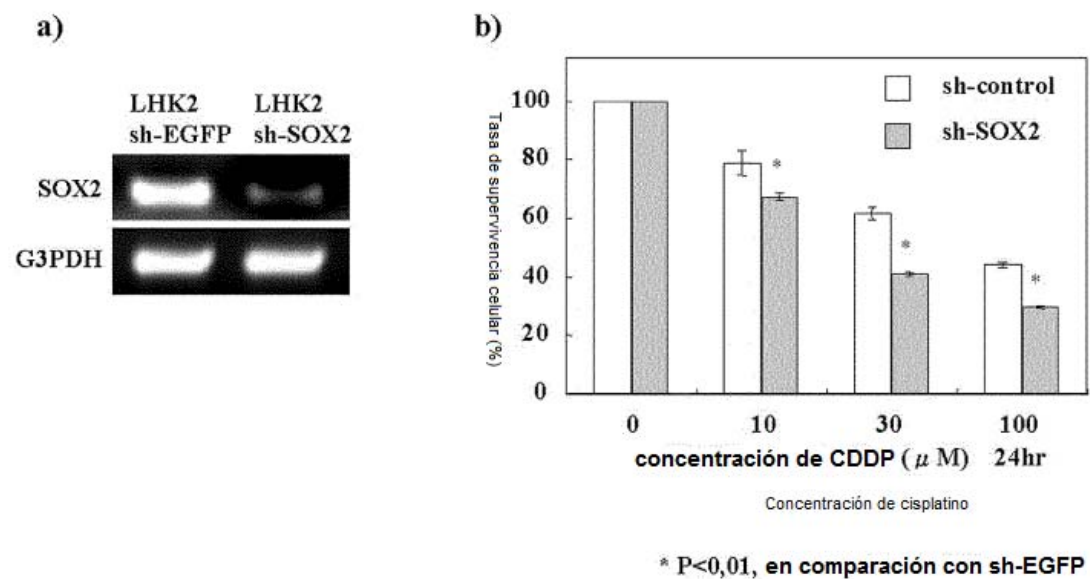
9 semanas después de la implantación tumoral
 $1,0 \times 10^4$ células LHK2-SOX2
 y simuladas



[Fig. 13]

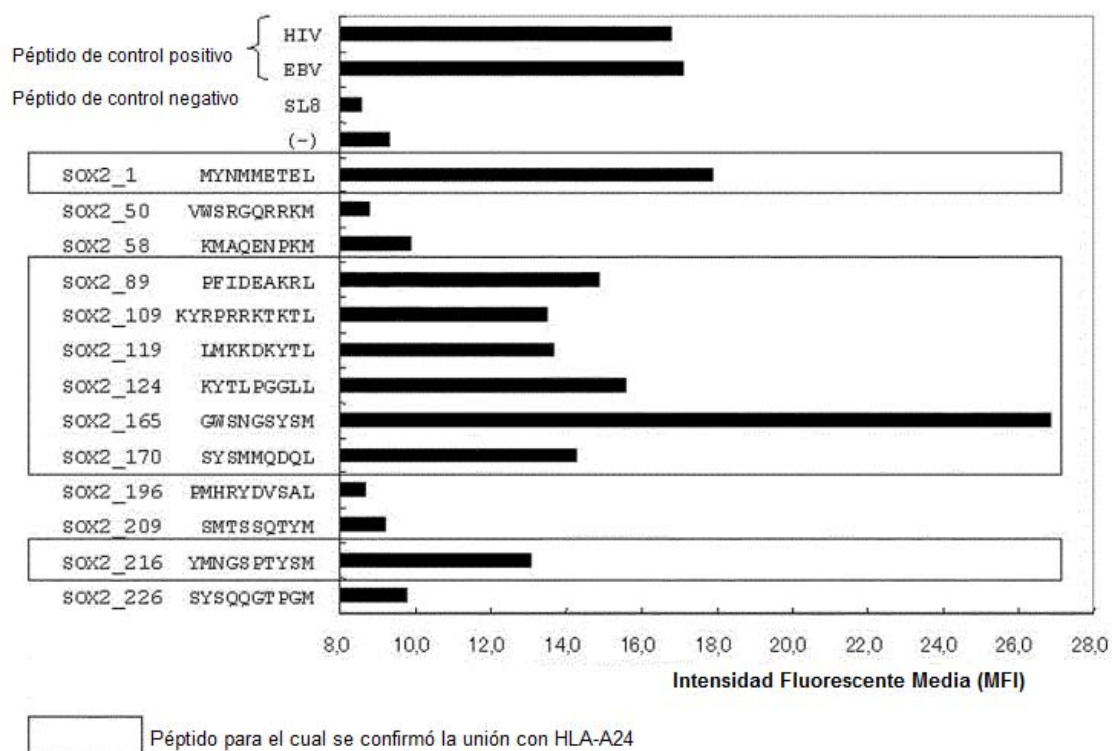


[Fig. 14]

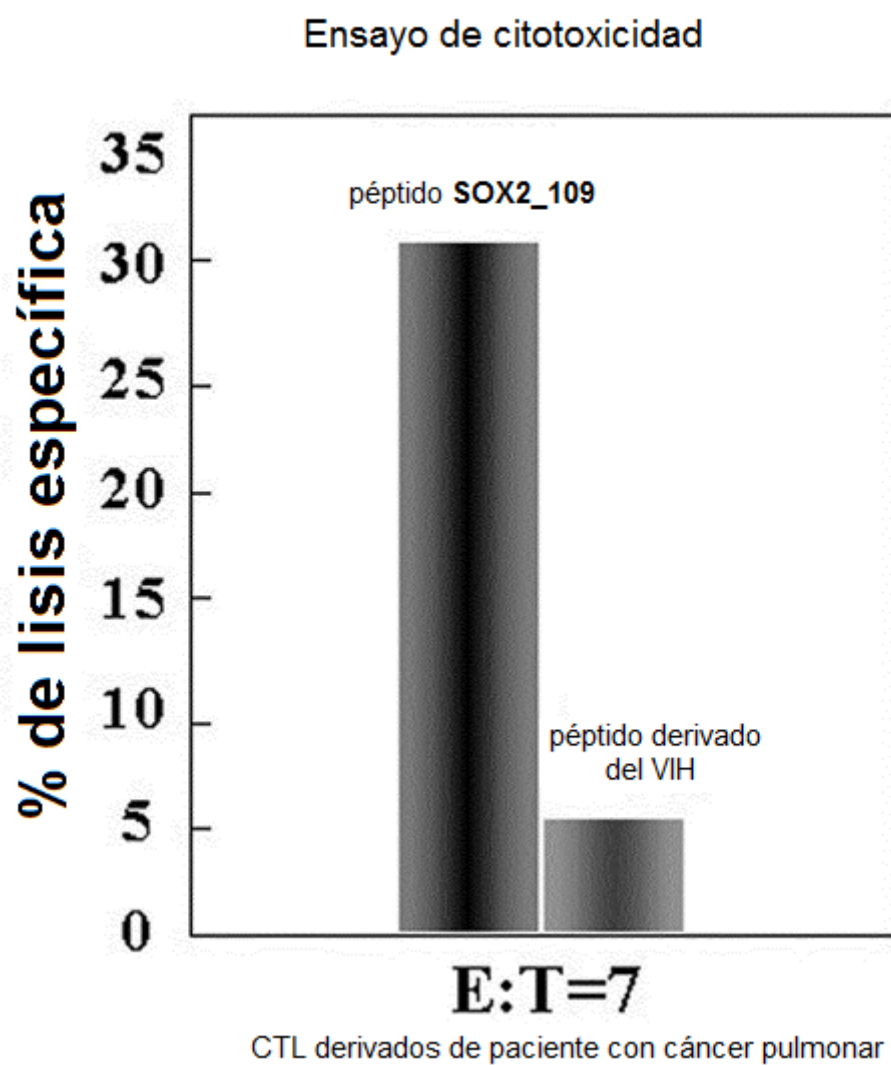


[Fig. 15]

ensayo de unión a HLA-A24 del péptido derivado de SOX2

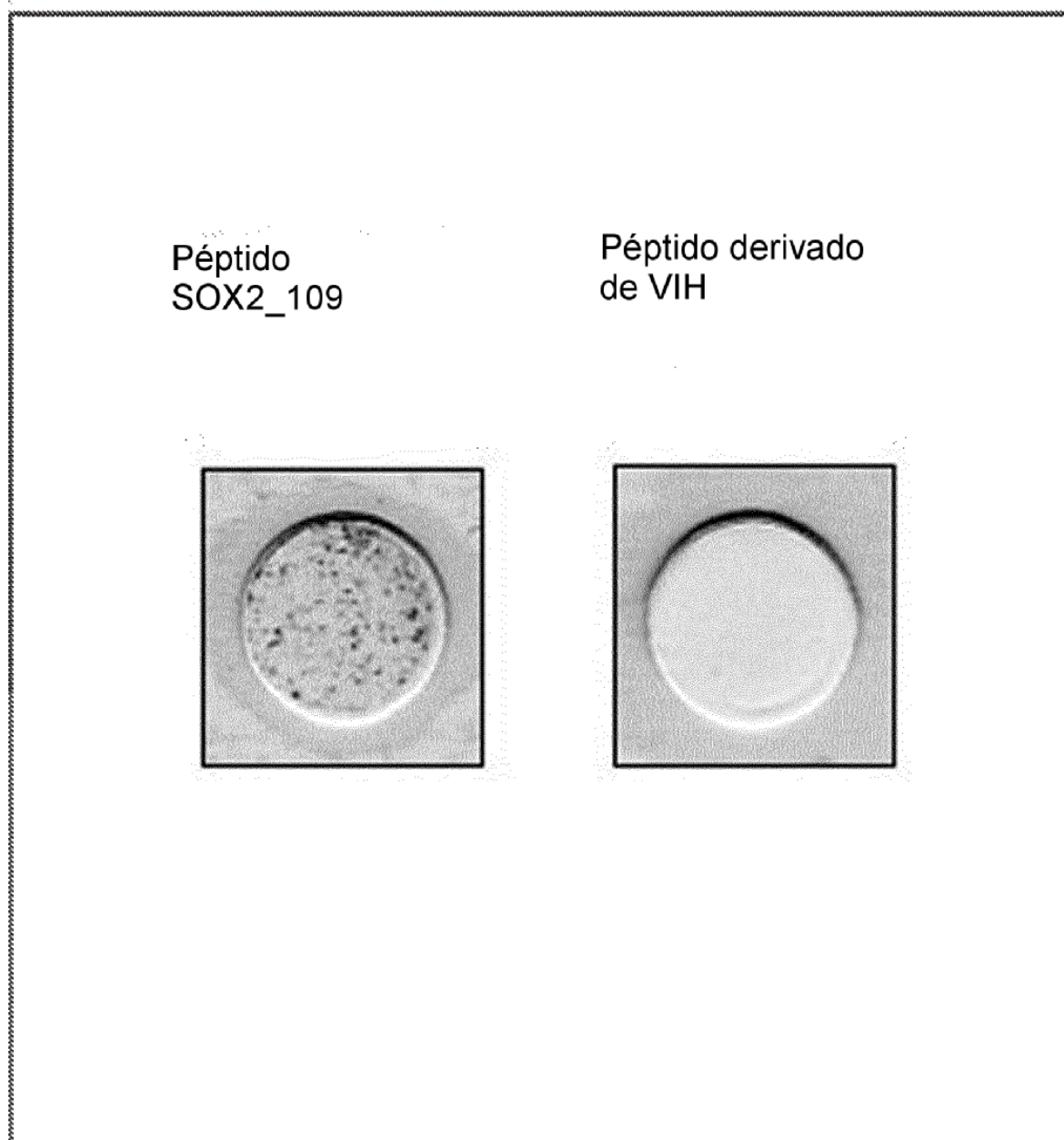


[Fig. 16]



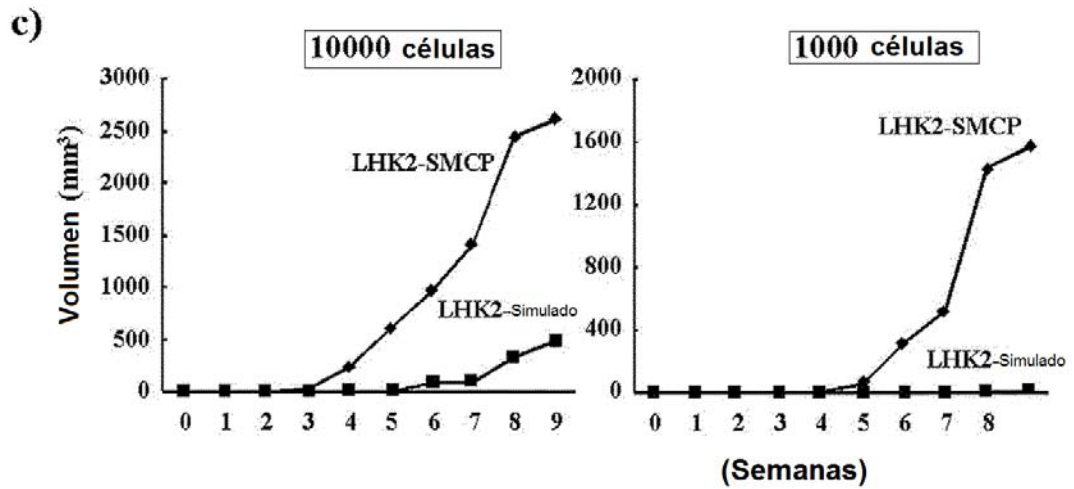
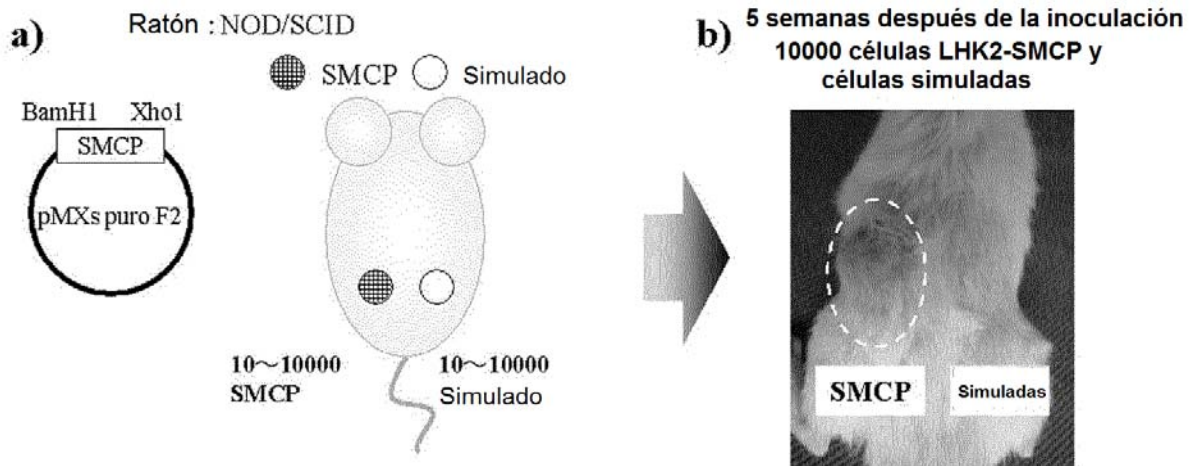
[Fig. 17]

Ensayo ELISPOT de interferón γ

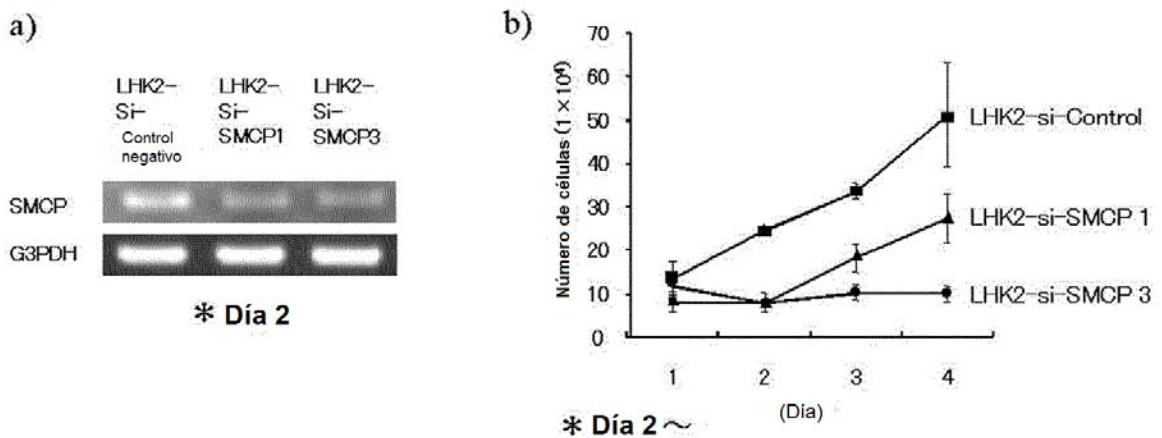


CTL derivados de una persona sana

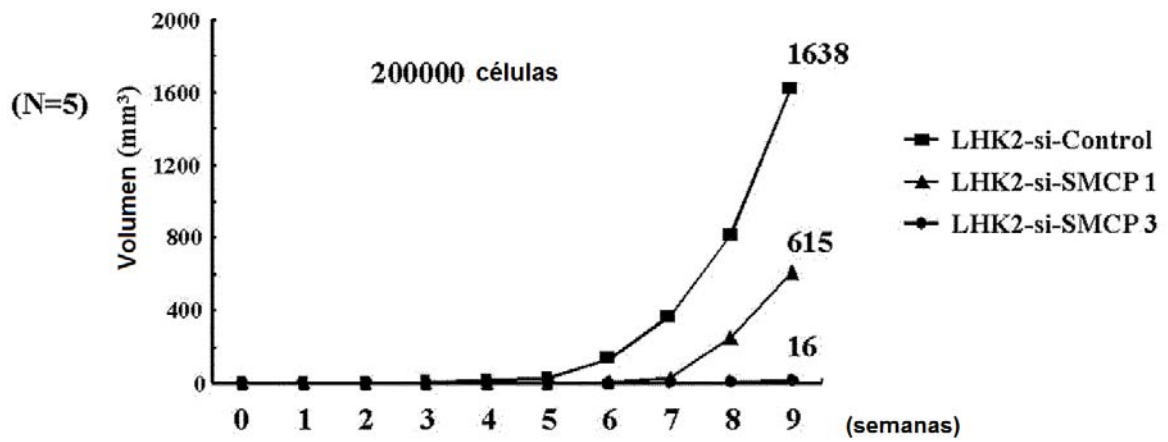
[Fig. 18]



[Fig. 19]

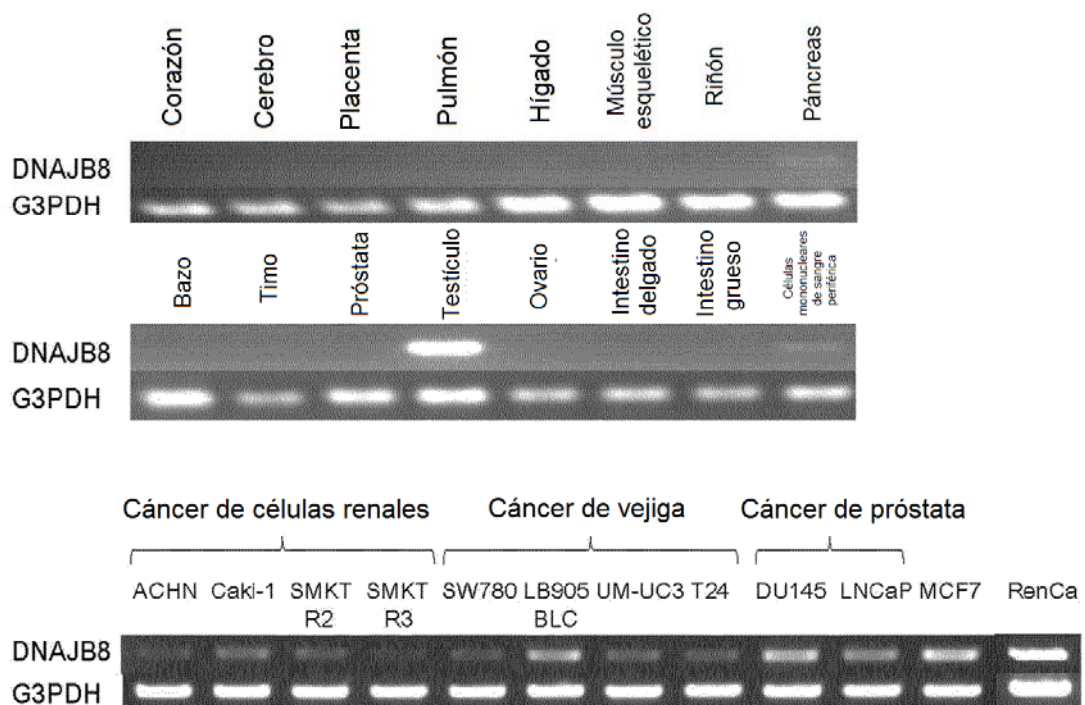


[Fig. 20]

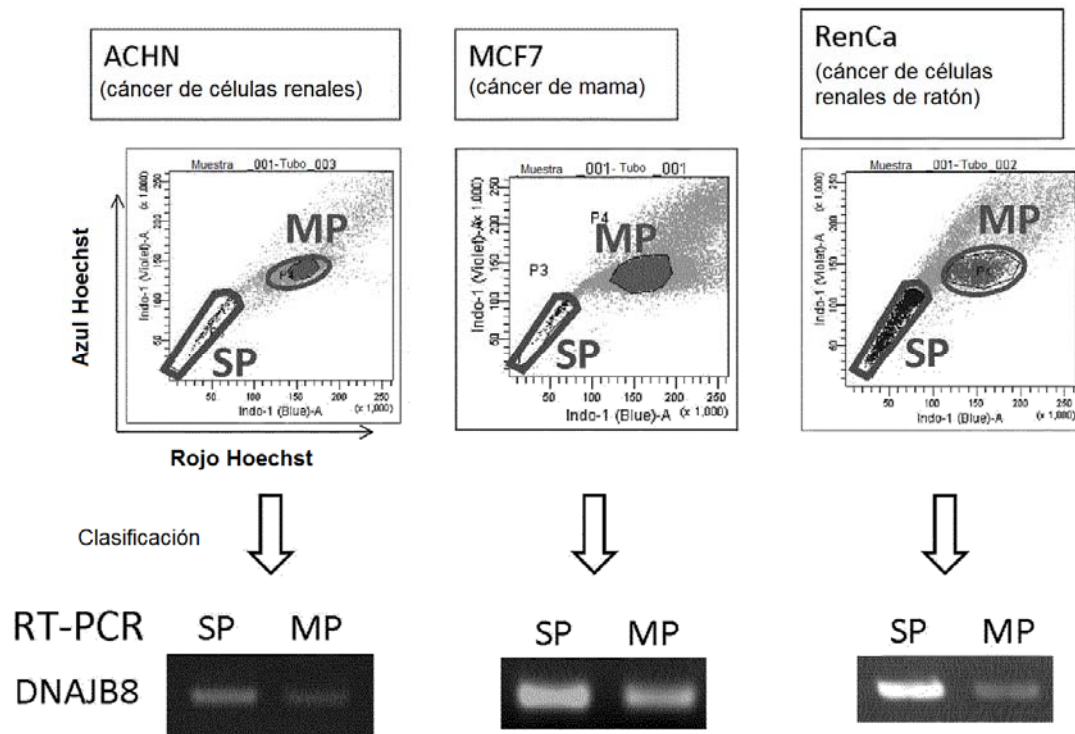


[Fig. 21]

Expresión de DNAJB8 por RT-PCR



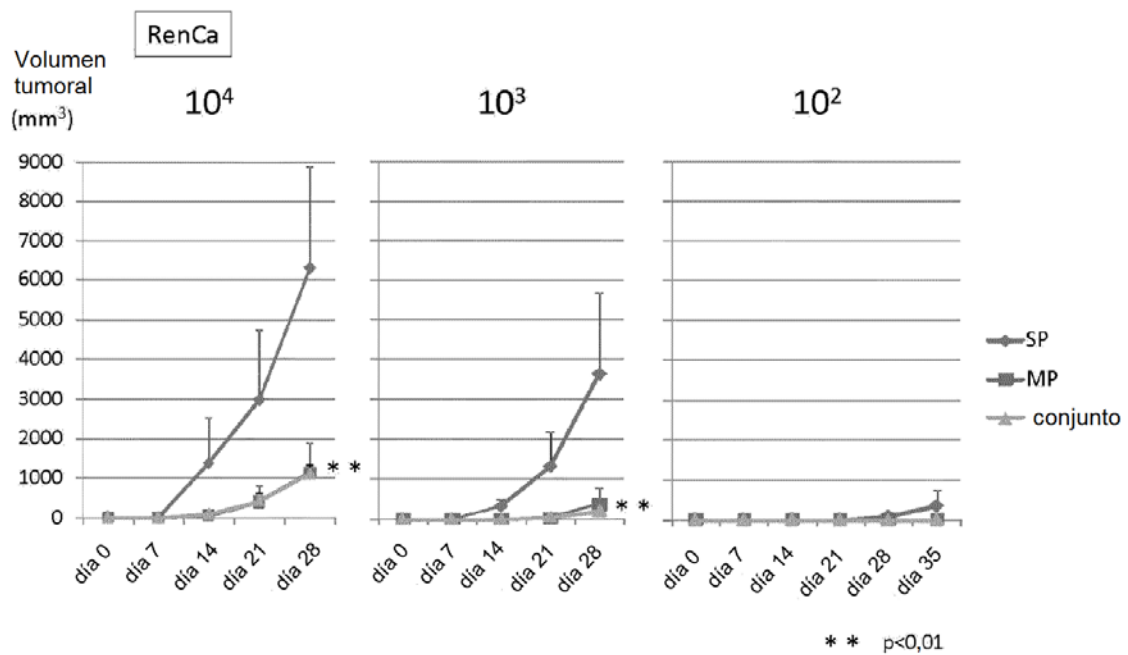
[Fig. 22]



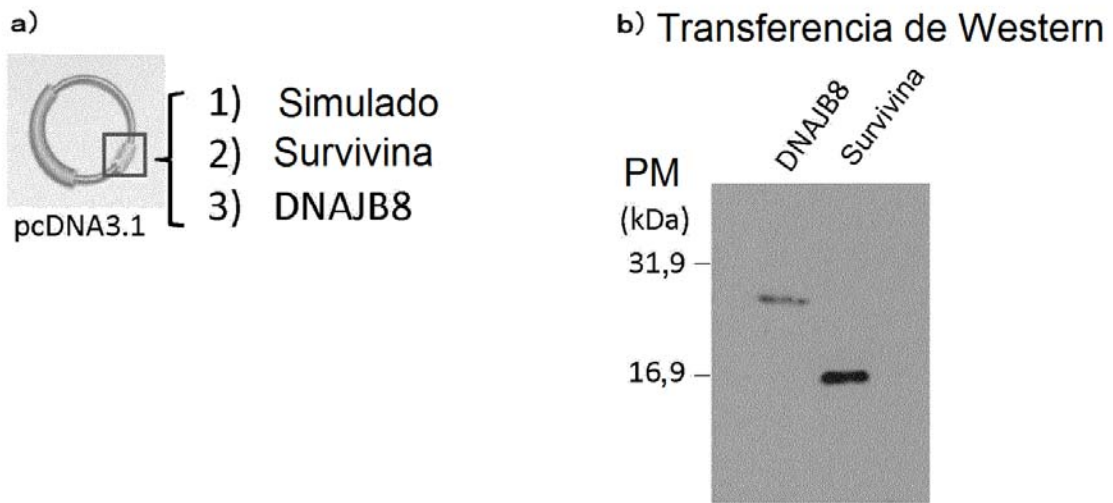
El nivel de expresión de DNAJB8 es mayor para SP que para MP

[Fig. 23]

ensayo de capacidad tumorigénica *in vivo*



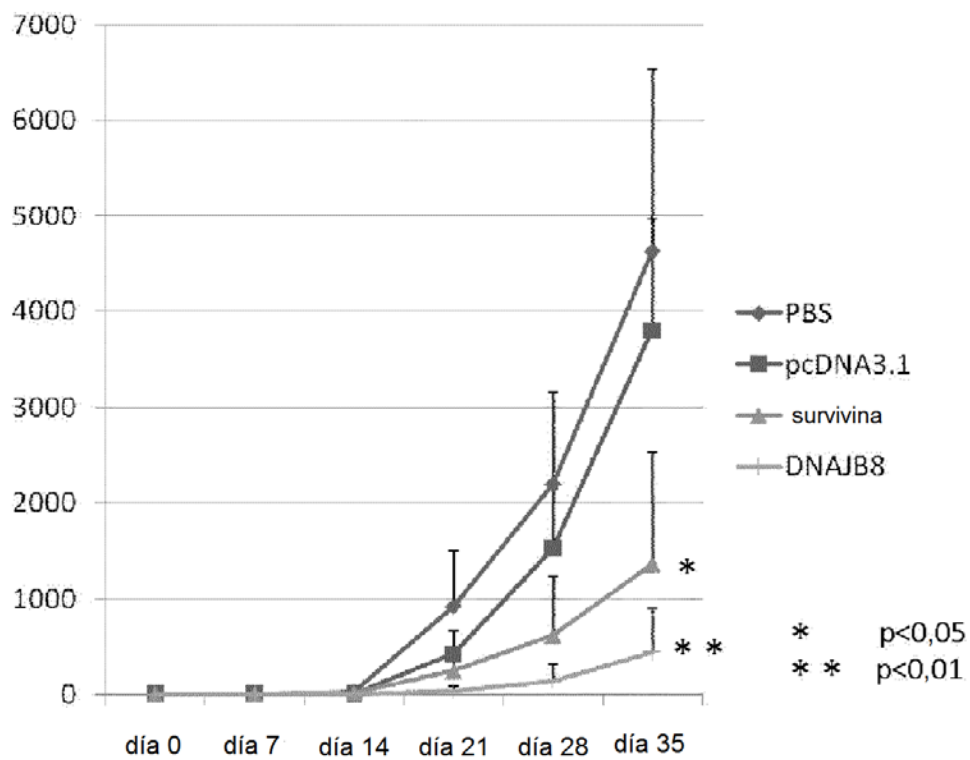
[Fig. 24]



[Fig. 25]

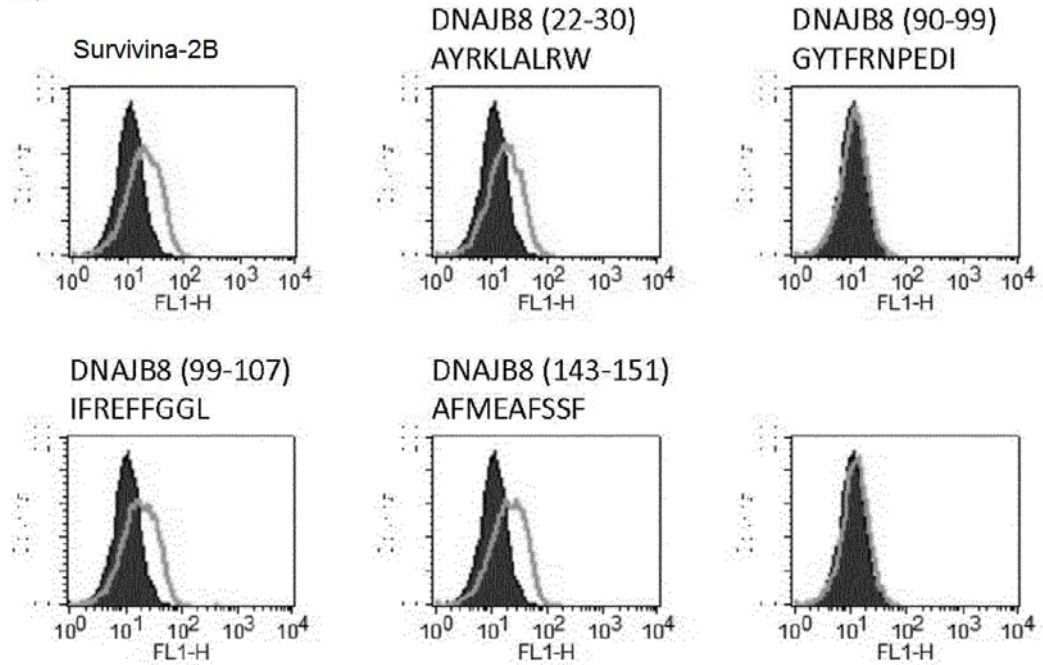
Cambio en el volumen tumoral tras la inoculación de la vacuna

Volumen tumoral (mm³)

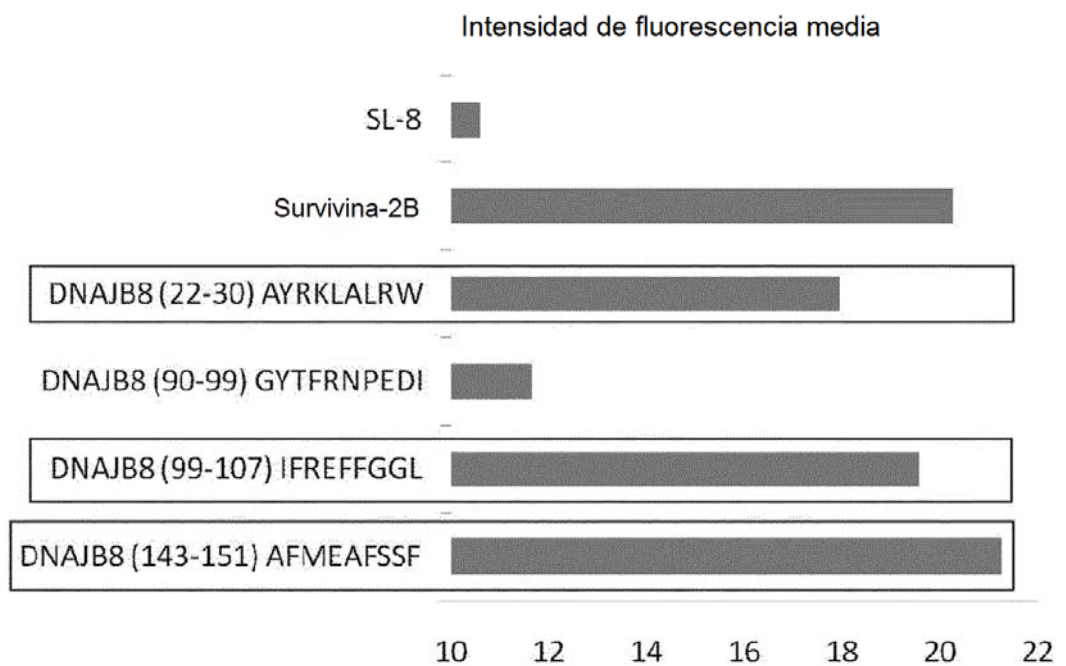


Ensayo de unión peptídica a molécula HLA-A24

a)



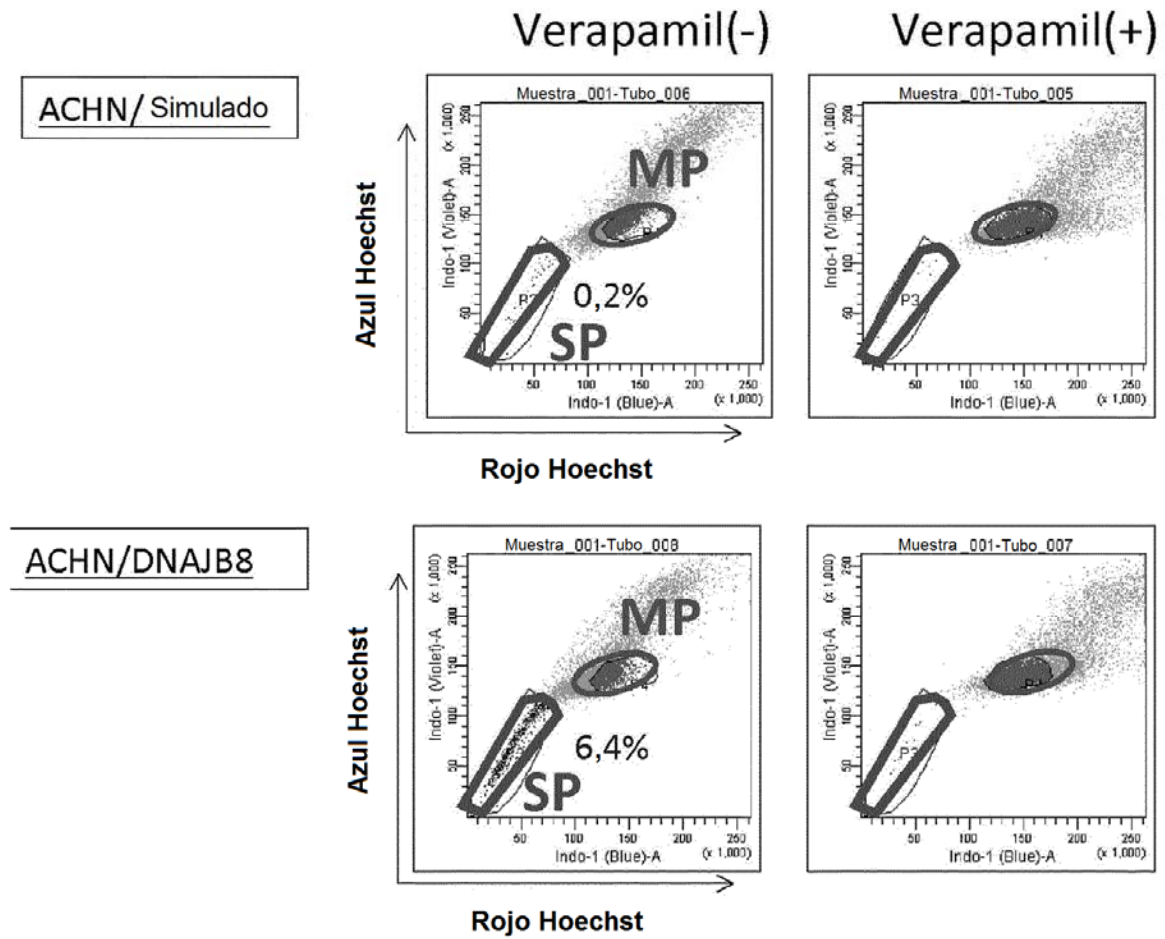
b)



[Fig. 26]

[Fig. 27]

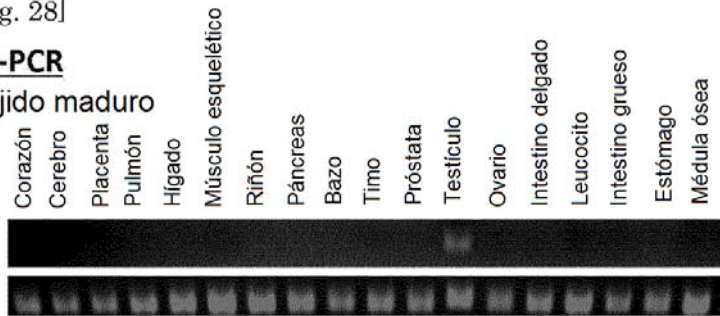
Análisis de células SP en la línea celular de expresión constitutiva de DNAJB8



[Fig. 28]

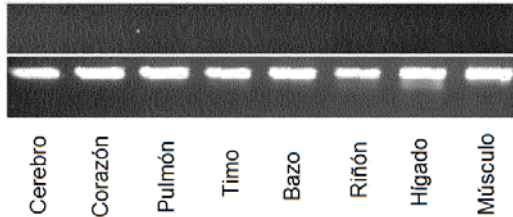
RT-PCR

Tejido maduro



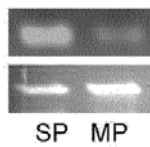
Nivel superior : or7c1
Nivel inferior : G3PDH

Tejido fetal

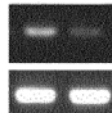


Células cancerosas cultivadas

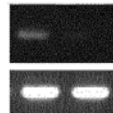
SW480



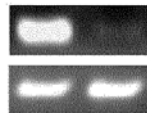
HT29



HCT15

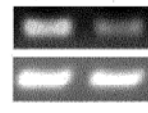


KM12LM



Línea celular de cáncer pulmonar

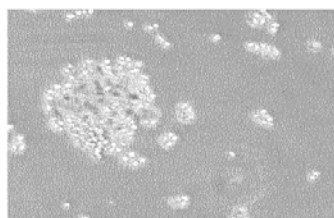
LHK2



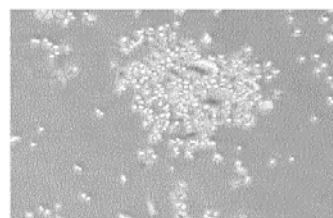
[Fig. 29]

Análisis de la morfología de líneas celulares de expresión/supresión constitutiva génica

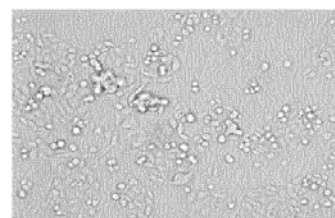
Morfología celular (Sw480)



simulado
no clasificado



transfectante estable de or7c1



inactivación por ARNip
de or7c1

RT-PCR
or7c1

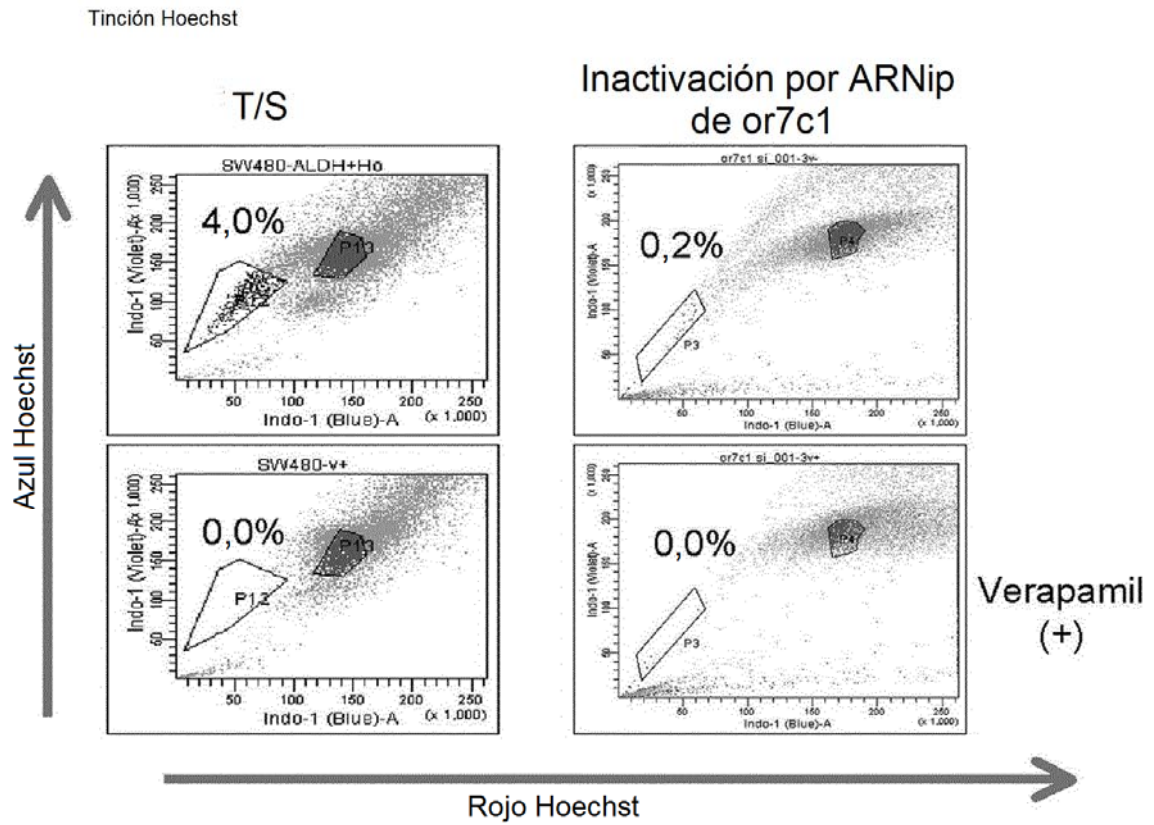


G3PDH



[Fig. 30]

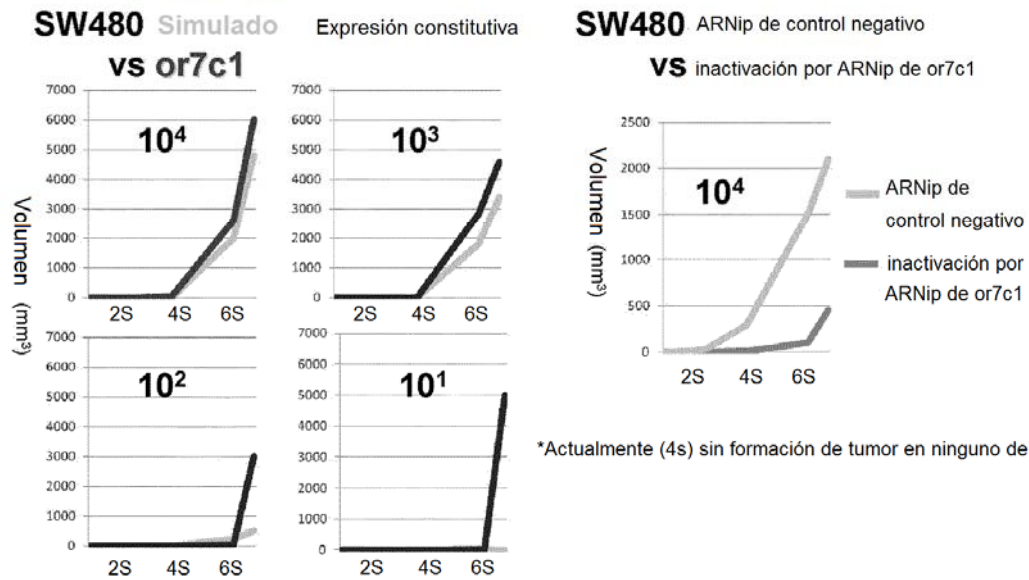
Análisis de morfología de líneas celulares de supresión génica



[Fig. 31]

Análisis de líneas celulares de expresión/supresión constitutiva génica

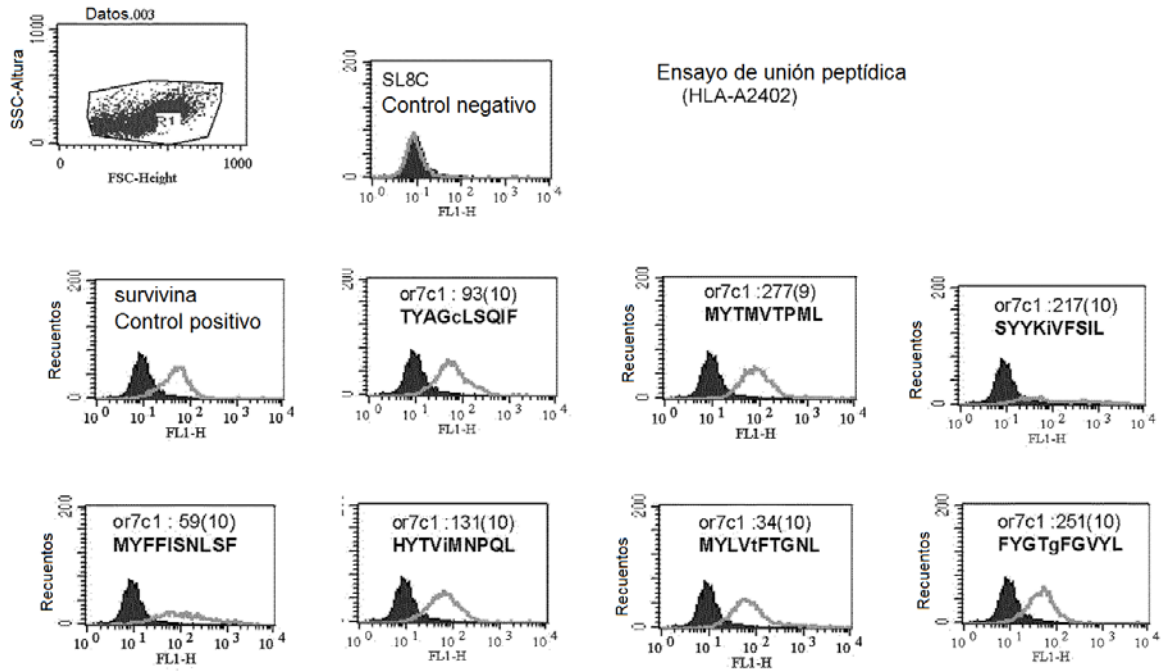
Experimento de implantación



*Actualmente (4s) sin formación de tumor en ninguno de 103, 102, 101

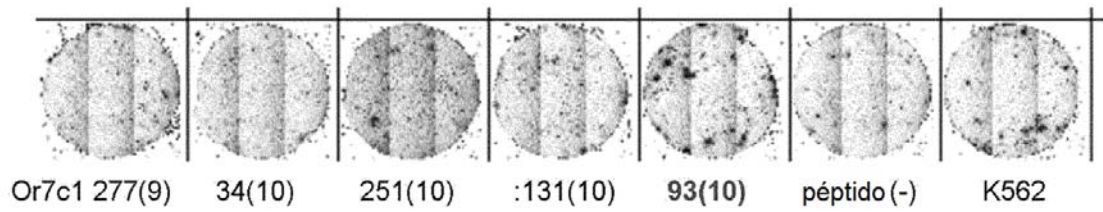
[Fig. 32]

Identificación de péptido HLA-A2402-restrictivo



[Fig. 33]

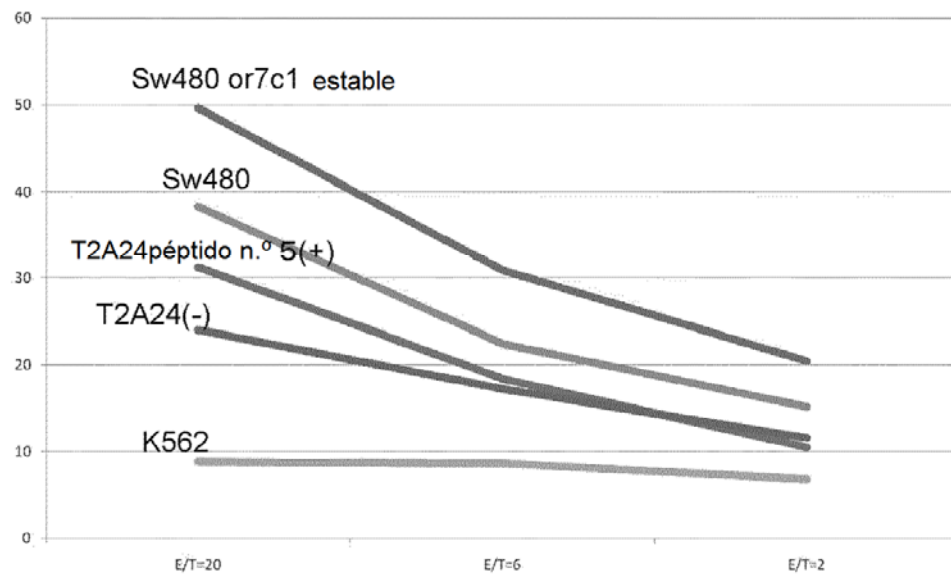
ELISPOT (IFN γ)



Efectora: CTL donante sano
Diana: T2A24, K562

[Fig. 34]

Ensayo de liberación de Cr⁵¹



Efectora: CTL donante sano
Diana: T2A24, K562