

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 877**

51 Int. Cl.:

C12N 5/095 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2013 PCT/EP2013/074166**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076302**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2013 E 13810902 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2920301**

54 Título: **Método para el aislamiento de células madre de mamíferos y usos de las mismas**

30 Prioridad:

19.11.2012 EP 12193206

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

08.03.2021

73 Titular/es:

HYPERSTEM SA (100.0%)

**Vía Pretorio 13
6900 Lugano, CH**

72 Inventor/es:

**BINDA, ELENA y
VESCOVI, ANGELO LUIGI**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 809 877 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

Método para el aislamiento de células madre de mamíferos y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la biología de las células madre, y en particular se refiere a un método para producir una población aislada de células madre tumorales de mamíferos, y a los usos de las células madre producidas de este modo.

10

Estado de la técnica

Las células madre son las células primarias de cada organismo pluricelular. Las dos categorías principales de células madre humanas son embrionarias (CME), que provienen de la masa celular interna del blastocisto, y células madre somáticas (CMS) que provienen de tejidos fetales o adultos. Las primeras pueden originar todos los fenotipos celulares del organismo, ya que se delegan en el desarrollo de todos los tejidos, mientras que las CM somáticas adultas originan los linajes celulares del tejido de origen y contribuyen a la homeostasis y reparación del tejido. La definición de una célula como madre requiere principalmente el cumplimiento de dos propiedades: la capacidad de proliferar ampliamente mientras se mantiene un fenotipo indiferenciado y estable, definido como "autorrenovación", y para diferenciarse en múltiples linajes celulares, "multipotencialidad". La última se define de forma variable según la fuente de CM.

15

20

En resumen, las células madre, por la definición más simple, son una población única de células distinguibles que poseen la capacidad de autorrenovarse, proliferar y de diferenciarse en tejidos especializados.

25

Las células madre hematopoyéticas (CMH) son las células madre adultas más estudiadas y han disfrutado de la traducción más exitosa a la clínica. Las CMH se pueden dividir en dos clases de células, a saber, células repobladoras a largo y a corto plazo, con la progenie de estas células pudiendo diferenciarse en el repertorio de linajes de células sanguíneas.

30

Además de las CMH, las células madre adultas también se han estudiado ampliamente en la piel, el intestino delgado y, más recientemente, se han identificado en el músculo, hígado, próstata, mama, corazón y cerebro. En general, todos estos compartimentos de tejido comparten la presencia de una célula de baja frecuencia que tiene la capacidad de proliferar y generar nuevas células que reemplazarán a las perdidas por lesiones, enfermedad y recambio celular normal, contribuyendo así a la homeostasis de la esperanza de vida del tejido.

35

Aunque tradicionalmente el único tejido donde no se deben encontrar células madre era el cerebro, actualmente se ha demostrado la neurogénesis adulta en el cerebro humano adulto, que persiste en regiones discretas del sistema nervioso central (SNC).

40

Las células madre neuronales (CMN) son las células neuronales más primitivas del SNC. Debido a que la mayoría de las células neuronales maduras, con particular referencia a las neuronas, son células muy especializadas y bastante sensibles a los cambios ambientales, tales como condiciones de oxígeno o moléculas ex-citotóxicas, la importancia de SNC en el mantenimiento del desarrollo y la homeostasis del tejido nervioso es esencial. El lento recambio de degenerar con células neuronales recién generadas en condiciones fisiológicas *in vivo* ha destacado que el SNC básicamente descansa en un estado de quiescencia, que permite mantener un equilibrio constante entre la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse sin agotar el conjunto de células madre (*stem pool*).

45

Uno de los temas más destacados en el campo de la biología y la terapia del cáncer es que un pequeño porcentaje de células con las propiedades cardinales de las células madre, llamadas células madre cancerosas (CMC) o células propagadoras de tumores (CPT), son responsables del origen y mantenimiento de tumores malignos sólidos.

50

Los gliomas malignos son los tumores primarios adultos del SNC más comúnmente diagnosticados y su incidencia está aumentando en todo el mundo. En general, no son tumores curables, con la mayoría de los pacientes sucumbiendo a su enfermedad independientemente del tratamiento. El glioma de grado IV, glioblastoma multiforme (GBM), es el glioma más maligno y común con una mediana de supervivencia de 9 a 15 meses a pesar de la terapia agresiva que combina obtención de imágenes de vanguardia con cirugía, radioterapia y quimioterapia.

55

El estudio de las células madre somáticas ciertamente ayudaría a comprender los elementos celulares responsables de la progresión del cáncer y la resistencia al tratamiento, y la ventaja de estudiar una población de células única o definida, a diferencia de poblaciones grandes o menos definidas, probablemente beneficiará no solo la comprensión de la contribución que hacen las diferentes poblaciones al crecimiento y la resistencia tumoral, sino que también permitirá un mapeo más detallado y preciso de la heterogeneidad tumoral.

60

Se han hecho muchos intentos para un aislamiento eficiente de células madre de buena fe, que deben estar en un número suficiente y en las condiciones necesarias para la proliferación.

65

5 Las células propagadoras de tumores cerebrales comparten características similares a las normales del SNC, incluyendo la expresión de varios marcadores, la capacidad de autorrenovación y diferenciación, y las vías de señalización involucradas en la regulación de la supervivencia y proliferación celular. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos reguladores de la neurogénesis normal puede llevar a la identificación de nuevos inhibidores de las CPT cerebrales y puede dar como resultado el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas y más específicas para el cáncer cerebral.

10 El documento WO 2012/042021 analiza el aislamiento de células madre de cáncer derivadas de glioblastoma multiforme de muestras tumorales. Goichberg et al., "The Ephrin A1-EphA2 system promotes cardiac stem cell migration after infarction", circulation research, vol. 108, n.º 9, publicado el 17 de marzo de 2011 analiza el aislamiento de células madre cardíacas humanas a partir de muestras de miocardio.

15 Hasta la fecha, ningún marcador celular es absoluto para identificar células normales del SNC, ni en la identificación de CPT cerebrales.

20 No todas las células tumorales, que son marcadores positivos, son CPT cerebrales y no todas las CPT cerebrales expresan marcadores conocidos. Por ejemplo, para varios tipos de tumor cerebral, incluyendo un subgrupo de GBM primario, se descubrió que las CPT expresaban CD133. Sin embargo, el CD133 no parece ser esencial para las propiedades similares a las células madre, recientemente se han identificado subgrupos de GBM promovidos por CD133-CPT.

25 La necesidad y la importancia se sienten cada vez más para identificar un método, que permita aislar y obtener una población de células madre de buena fe, que mantienen un fenotipo indiferenciado y estable (autorrenovación), conservan la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares y se pueden usar en aplicaciones tan diferentes como la medicina regenerativa y el descubrimiento de fármacos.

30 Por lo tanto, es objeto de la presente invención proporcionar un método, que permita el aislamiento eficaz de células madre de mamíferos de tipo CM o CPT.

Sumario de la invención

La materia objeto de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 La invención proporciona un método para producir una población aislada de células madre tumorales de mamíferos enriquecidas en células madre cancerosas (CMC) o células propagadoras de tumores (CPT) que comprende las etapas de:

40 a. obtener una población de células proporcionadas a partir de una muestra de tejido, en donde la muestra de tejido es una muestra de tumor cerebral;

45 b. separar las células que expresan EphA2 mediante la clasificación celular, de acuerdo con su nivel de expresión EphA2, de la población de células de la etapa a, en donde una fracción alta de EphA2 de la población de células muestra una mayor capacidad de propagación del tumor que una fracción baja de EphA2 de la población de células; y

50 c. seleccionar las células de la fracción EphA2high separadas en la etapa b, produciendo así una población de células madre tumorales de mamíferos enriquecidas en células madre cancerosas o células propagadoras de tumores (CPT).

55 La invención proporciona además un uso de EphA2 como marcador de superficie celular para la identificación y el aislamiento de una célula madre tumoral de mamífero, en donde una célula madre tumoral con alta expresión de EphA2 tiene mayor capacidad de propagación del tumor que una célula madre tumoral con baja expresión de EphA2.

La presente invención se refiere a un método para producir una población aislada de células madre de buena fe de mamíferos que comprenden las etapas de:

60 a. proporcionar una población de células,
 b. seleccionar de la población de células de la etapa a. las células que expresan EphA2;
 c. aislar las células seleccionadas en la etapa b.,
 produciendo así una población de células madre CM o CPT de buena fe de mamíferos.

65 Tal como se describirá adicionalmente en la descripción detallada de la invención, el método de la presente invención tiene las ventajas de permitir el aislamiento de una población aislada de células madre tumorales de mamíferos enriquecidas en células madre cancerosas (CMC) o células propagadoras de tumores (CPT). Además se

desvela la población aislada de células madre de buena fe de mamífero que se pueden obtener por el método de la invención.

5 Además se desvela el uso de la población aislada de células madre de buena fe de mamíferos según la invención, para la detección de un compuesto que tiene una actividad inhibitora sobre el crecimiento de dichas células madre.

Otro aspecto adicional de la presente invención es el uso de EphA2 como marcador de la superficie celular para la identificación y el aislamiento de una célula madre tumoral de mamífero.

10 **Breve descripción de los dibujos**

Las características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que se presenta a continuación, de los Ejemplos dados con fines ilustrativos y no limitativos, y de las Figuras 1-2 anexas, en donde:

15 **Figura 1: muestra el enriquecimiento del conjunto tumorigénico de tipo células madre basado en los niveles de EphA2**

20 (A) Las células tumorales viables (yoduro de propidio negativo) aisladas de forma aguda a partir de muestras de hGBM o células madre neuronales normales humanas establecidas (arriba a la izquierda) se clasificaron en las fracciones EphA2^{High} (alta expresión) y EphA2^{Low} (baja expresión) (abajo a la izquierda). La fracción EphA2^{High} mostró un índice clonogénico mayor que la fracción EphA2^{Low} (derecha) (n=4 tumores). Barras de errores: EEM; **p=0,0004 para EphA2^{High} frente a EphA2^{Low} por la prueba la t de Student.

25 (B) El trasplante intracraneal de 6x10⁴ células EphA2^{High} o células EphA2^{Low} confirmó la capacidad de propagación del tumor mucho más alta de la primera (prueba MC, p-valor de rango logarítmico <0,0001 para EphA2^{High} frente a EphA2^{Low}; n=8).

30 (C) Las imágenes confocales muestran una colocalización generalizada (puntas de flecha; amarillo) de EphA2 (rojo) y SSEA-1 (verde) en tejido hGBM. Barra, 20 μm.

(D) Las células del mismo hGBM se clasificaron y activaron de acuerdo con los niveles de EphA2 y SSEA-1.

35 (E) Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier muestran que los ratones que reciben intracranalmente 2x10⁴ y 1x10⁴ CPT purificadas con EphA2^{High}SSEA-1^{High} mueren antes (supervivencia media: 135 y 164 días, respectivamente) que los ratones que reciben células EphA2^{Low}SSEA-1^{Low} (56 % y 67 % de supervivencia a los 230 días, respectivamente). Pruebas de MC y GBW, p-valor de log rank <0,0001 EphA2^{High}SSEA-1^{High} frente a EphA2^{Low}SSEA-1^{Low}; n=9). La supervivencia también fue más corta al implantar 4x10⁴ CPT EphA2^{High}SSEA-1^{High} en comparación con las CPT EphA2^{Low}SSEA-1^{Low}.

40 (F) Trasplante intracraneal de dilución limitante de CPT cultivadas, marcadas con luciferasa y clasificadas en los grupos EphA2^{High} y EphA2^{Low} (arriba). El análisis de imágenes de emisión de luz (abajo; 5.000, 1.000 y 100 células por ratón) muestra una mayor capacidad de iniciación tumoral de las CPT EphA2^{High} frente a las EphA2^{Low}. Barras de errores, EEM; ***p<0,0001, **p=0,002, EphA2^{High} frente a EphA2^{Low}.

45 (G) El análisis de Kaplan-Meier muestra que los ratones que reciben CPT EphA2^{High} mueren antes que los ratones que reciben células EphA2^{Low} (pruebas MC y GBW, p-valor de log-rank <0,0001 EphA2^{High} frente a EphA2^{Low}; n=9).

50 **Figura 2: muestra que las CPT EphA2^{High} están enriquecidas en células iniciadoras de tumores y mantienen el crecimiento tumoral *in vivo*.**

(A-B) Se tiñeron dos tejidos de glioblastomas humanos independientes, se activaron y se clasificaron por FACS de acuerdo con la expresión EphA2. El GBM n.º 23 se muestra como un ejemplo. Barra, 10 μm.

55 (C) Crecimiento intracraneal de poblaciones tumorales no cultivadas purificadas con EphA2 purificadas de tejidos GBM n.º 23 o GBM n.º 25 e inyectadas a diferentes concentraciones en ratones Scid/bg. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier muestran que las dosis más bajas (2x10⁴ o 1x10⁴ células) de células purificadas con EphA2^{High} conservaron la capacidad de generar tumores con alta eficacia, mientras que la población de EphA2^{Low} mostró una capacidad tumorigénica reducida o nula. La supervivencia también fue más corta al implantar 4x10⁴ células EphA2^{High} en comparación con células EphA2^{Low}. (Pruebas MC y GBW, p-valor de log-rank <0,0001 de células EphA2^{High} frente a EphA2^{Low}; n=8). El crecimiento tumoral se evaluó durante un período de 6 meses.

60 (D) Inmunohistoquímica para EphA2 (verde) y el marcador CD44 relacionado con células madre (rojo) en un glioblastoma humano (GBM n.º 24). Las flechas denotan la colocalización de proteínas (amarillo). Recuadro: sin anticuerpo primario. Barra, 10 μm.

(E) Gráficos de flujo que muestran el análisis de citometría de flujo de EphA2 y CD44 en la misma muestra de glioblastoma.

5 (F) Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el crecimiento intracraneal de poblaciones purificadas con EphA2/CD44 que provienen de tejidos de GBM n.º 24 e inyectadas a diferentes concentraciones en ratones Scid/bg. Los ratones que reciben dosis más bajas (2×10^4 o 1×10^4) de las CPT purificadas con EphA2^{High}CD44^{High} mueren significativamente antes de los tumores (supervivencia media: 162 y 187 días, respectivamente) que los ratones que reciben células EphA2^{Low}CD44^{Low} (55 % y 73 % de supervivencia a los 190 y 215 días, respectivamente). Pruebas de MC y GBW, p-valor de log-rank <0,0001 de células EphA2^{High}CD44^{High} frente a células
10 EphA2^{Low}CD44^{Low}; n=11. El trasplante intracraneal de 4×10^4 células EphA2^{High}CD44^{High} o EphA2^{Low}CD44^{Low} confirmó la capacidad de propagación del tumor mucho más alta de las primeras. Pruebas de MC y GBW, p-valor de log-rank <0,0001 de células EphA2^{High}CD44^{High} frente a células EphA2^{Low}CD44^{Low}; n=11.

15 (G) Frecuencia estimada de TIC de hGBM en fracciones celulares de EphA2^{High}, EphA2^{High}SSEA-1^{Alto} y EphA2^{Alto}CD44^{High} enriquecidas con FACS, también en comparación con células EphA2^{Low}, EphA2^{Low}SSEA-1^{Low} y EphA2^{Low}CD44^{Low}, que se obtienen directamente de las muestras de pacientes con hGBM y se exponen en un entorno de trasplante ortotópico (intracraneal) mediante un enfoque de ensayo de dilución limitante. En todos los casos, la frecuencia de la TIC de hGBM fue significativamente mayor (p <0,0001) en las fracciones celulares "high" (alta) frente a la "low" (baja). La media de supervivencia se indica para la dosis más baja de células trasplantadas.
20

Figura 3: muestra el enriquecimiento de las células madre neuronales normales humanas establecidas basándose en los niveles de EphA2

25 (A) Se tiñeron células madre neuronales normales humanas, se activaron y se clasificaron por FACS de acuerdo con la expresión EphA2.

(B) Ensayo de eficiencia clonal de las células madre neuronales normales humanas, en donde la fracción EphA2^{High} (columna izquierda) muestra un índice clonogénico más alto que la fracción EphA2^{Low} (columna derecha).

30 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir una población aislada de células madre tumorales de mamífero enriquecidas en células madre cancerosas (CMC) o células propagadoras de tumores (CPT) que comprende las etapas de:

- 35 a. proporcionar una población de células,
b. seleccionar de la población de células de la etapa a. las células que expresan EphA2;
c. aislar las células seleccionadas en la etapa b.,

40 produciendo así una población de células madre tumorales de mamíferos.

En la presente invención, se pretende que una población aislada de células signifique un grupo de células con características similares, tal como un fenotipo indiferenciado y estable, la capacidad de proliferar a través de múltiples etapas y diferenciarse en múltiples linajes celulares.

45 EphA2 (ID del gen de homo sapiens: 1969; GI: 32967311; protein_id: NP_004422.2; ID del gen de mus musculus: 13836; GI: 32484983; protein_id: NP_034269.2) pertenece a la subfamilia de receptores de efrina de la familia de proteína-tirosina quinasa. Eph y los receptores relacionados con Eph han estado implicados en la mediación de eventos del desarrollo, particularmente en el sistema nervioso. El ligando afín de EphA2 es ephrinA1.
50

El método de acuerdo con la presente invención tiene las ventajas inesperadas de enriquecer para CPT por FACS basado en altos niveles de expresión de EphA2.

55 Clasificación citofluorimétrica en las poblaciones EphA2^{High} y EphA2^{Low} demostraron que la expresión de EphA2 se correlaciona con el tamaño y la capacidad de propagación del tumor del grupo de las CPT en hGBM.

Si bien los estudios con líneas celulares de glioma han implicado a EphA2 en el crecimiento celular y la invasividad, la identidad y la naturaleza de las células diana reales en el GBM de los pacientes siguen sin estar claras.

60 Además, las funciones celulares afectadas por EphA2, los mecanismos reguladores que sustentan las acciones de EphA2 en la fisiopatología de hGBM y la posibilidad de manipular este sistema para suprimir el crecimiento de glioma no están bien caracterizados. Los hGBM contienen subpoblaciones de células que actúan como CPT de tipo células madre, que ahora han demostrado ser dianas terapéuticas cruciales.

65 La identificación y caracterización de mecanismos reguladores clave en las CPT es crucial para el desarrollo de terapias específicas para hGBM. La abundancia de EphA2 en las CPT proporciona una medida de su potencial de

tipo células madre y la capacidad de propagación de tumores de las CPT a partir del hGBM. Por lo tanto, los altos niveles de EphA2 se pueden usar para enriquecer las CPT mediante la clasificación celular. El método según la presente invención enfatiza la importancia de los enfoques que explotan similitudes fundamentales en la fisiología de las células madre neuronales normales y sus homólogos de tipo células madre propagadoras del tumor en tumores cerebrales. Tales enfoques pueden hacer uso de la gran cantidad de información derivada de estudios sobre sistemas reguladores en células madre neuronales normales para identificar efectores candidatos capaces de afectar a las CPT, ayudando así a diseñar terapias anti-GBM más eficaces y específicas.

La invención se refiere a un método, en donde dicha población de células se obtiene de una muestra de tejido en donde la muestra de tejido es una muestra de tumor cerebral, preferentemente de una biopsia, preferentemente de una biopsia cerebral.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método, en donde dicha etapa de selección b. se lleva a cabo mediante clasificación celular, preferentemente por clasificación celular activada por fluorescencia.

La clasificación celular activada por fluorescencia (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) es un tipo especializado de citometría de flujo. Proporciona un método para clasificar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más contenedores, una célula a la vez, basándose en la dispersión de luz específica y las características fluorescentes de cada célula.

Es un instrumento científico útil, ya que proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de señales fluorescentes de células individuales.

Los clasificadores de flujo se han convertido en un recurso generalizado y vital en las ciencias biológicas y más allá. Su objetivo principal es recuperar las poblaciones de interés de una población heterogénea para su posterior estudio. Si una célula o partícula se puede identificar específicamente por sus características físicas o químicas, se puede separar utilizando un clasificador de flujo.

El poder de la citometría de flujo es que puede utilizar análisis multiparamétricos para identificar poblaciones altamente específicas.

En otro aspecto adicional más, la invención se refiere a un método, en donde dicha etapa de selección b. permite clasificar las células según su nivel de expresión de EphA2.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método, en donde dicho nivel de expresión de EphA2 se mide con un anticuerpo anti-EphA2.

En otro aspecto adicional más, la invención se refiere a un método, en donde las células madre tumorales de mamífero aisladas en la etapa c. se seleccionan del grupo que consiste en células madre tumorales humanas y de ratón.

En otro aspecto adicional más, la invención se refiere a un método, en donde las células madre tumorales humanas y de ratón son preferente células madre neuronales humanas o de ratón, más preferentemente precursores y progenitores neuronales humanos o de ratón.

En otro aspecto adicional, las células madre tumorales de mamífero aisladas en la etapa c del método de la presente invención, son células madre de tumor cerebral, más preferentemente células madre multiformes de glioblastoma humano.

El crecimiento persistente de los cánceres, la diversificación clonal y evolución, la metástasis tumoral y la recurrencia después de la terapia pueden ser las consecuencias del mantenimiento por parte de las células tumorales del potencial proliferativo de las células madre de las cuales el tumor puede haberse originado.

El método de la presente invención tiene las ventajas de permitir el aislamiento de células madre, lo que permite avanzar hacia una comprensión de los elementos celulares responsables de la progresión del cáncer y la resistencia al tratamiento. Una de las ventajas de estudiar una población de células única o definida, a diferencia de poblaciones grandes o menos definidas, beneficiará no solo a la comprensión de la contribución que hacen las diferentes poblaciones al crecimiento y la resistencia tumoral, sino que también permite un mapeo más detallado y preciso de la heterogeneidad tumoral.

Solo las terapias que eliminan eficazmente la fracción de células madre de un tumor pueden inducir respuestas a largo plazo y, por lo tanto, detener la progresión del tumor.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método, en donde dicho EphA2 es un marcador de superficie de células madre tumorales.

Mientras que las células madre cancerosas comparten algunas propiedades con las células madre o células progenitoras somáticas normales, son distintas de las células madre normales a niveles de señalización genética y molecular.

- 5 Por lo tanto, la identificación de marcadores específicos que están involucrados en la autorrenovación y la supervivencia de las CPT puede ser útil para desarrollar estrategias novedosas para mejorar el tratamiento.

De manera específica, el bloqueo de vías de señalización distintivas, tal como la señalización Eph, requerida en células madre, se debe usar para agotar la población de células madre cancerosas, mientras que los agentes quimioterapéuticos tradicionales se podrían usar al mismo tiempo para descongelar la mayor masa de células tumorales. Esto dará como resultado una eliminación rápida de ambas subpoblaciones, evitando la posibilidad de que algunas células tumorales puedan dar lugar a la recurrencia del tumor. Además se desvela una población aislada de células madre de buena fe de mamíferos, que se puede obtener por el método de acuerdo con la presente invención.

15 El aislamiento y la caracterización de las células multipotentes del SNC de múltiples ubicaciones dentro del cerebro de los mamíferos representa uno de los avances más significativos en neurociencia y proporciona evidencia acumulada del potencial endógeno del SNC para responder a lesiones neurológicas. Esta población aislada de células madre de mamíferos tiene la ventaja de superar el desafío técnico de ser fácilmente mantenida y cultivada en el laboratorio y permitir el estudio de terapias basadas en células madre como las que proponen tratar afecciones médicas humanas mediante la sustitución de células que se han perdido o dañado por enfermedad o lesión. Estas células se pueden usar ventajosamente para generar derivados de células madre en el laboratorio que tienen al menos algunos de los tipos celulares normales maduros.

- 25 Además se desvela el uso de la población aislada de células madre de mamíferos de acuerdo con la invención, para la detección de un compuesto que tiene una actividad inhibitoria sobre el crecimiento de dichas células madre.

Los tumores malignos, o al menos algunos de ellos, comprenden células madre cancerosas y, por lo tanto, brindan nuevas oportunidades tanto a nivel experimental como clínico. De hecho, tener una población aislada de células madre de mamíferos obtenidas por el método de la presente invención permite la investigación de las células que, aunque son un grupo celular menor dentro de la masa tumoral general, probablemente sean el verdadero culpable responsable de establecer, expandir el tumor y perpetuarlo después de la cirugía.

Otro aspecto adicional de la presente invención es el uso de EphA2 como marcador de la superficie celular para la identificación y el aislamiento de una célula madre tumoral de mamífero.

40 Clasificación citofluorimétrica en EphA2^{High} (alta expresión) y EphA2^{Low} (baja expresión) demuestra que la expresión de EphA2 se puede usar para enriquecer tanto para CM como para CPT y que la expresión de EphA2 se correlaciona con el tamaño y la capacidad de propagación de tumores del grupo de CPT en hGBM.

La invención se refiere al uso de EphA2 como marcador de superficie celular para la identificación y el aislamiento de una célula madre tumoral de mamífero, en donde dicha célula madre es una célula madre tumoral humana o de ratón.

45 En un aspecto aún más preferido, la invención se refiere al uso de EphA2 como marcador de superficie celular para la identificación y el aislamiento de una célula madre tumoral de mamífero, en donde dicha célula madre es una célula madre de tumor cerebral, más preferentemente una célula madre multiforme de glioblastoma, aún más preferentemente una célula madre multiforme de glioblastoma humano.

50 La identificación y el aislamiento eficaz de una célula madre tumoral, en particular de una célula madre de tumor cerebral, en donde se cree que las vías clave que regulan la autorrenovación y el destino celular están desreguladas, lo que conduce a una autorrenovación incontrolada, permitiría obtener una población de esas células madre cancerosas que generan y propagan tumores y que son resistentes a las terapias convencionales para una visión más eficaz de una terapia exitosa.

55 Ejemplos

Ejemplo 1.

60 Análisis FACS

Los tejidos se obtuvieron y se clasificaron de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud. Para estudios que utilizan material derivado de tumores, se utilizaron tejidos de glioblastoma humano adulto (hGBM), para estudios que utilizan material no obtenido del tumor, se utilizaron tejidos cerebrales humanos normales o tejidos cerebrales de ratón. Los tejidos fueron diseccionados y digeridos en una solución de papaína y se obtuvo una suspensión de células individuales. Para el análisis de clasificación celular, las células se centrifugaron y se

resuspendieron en PBS que contenía desoxirribonucleasa (1 µg/ml; Sigma). Las células se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-EphA2 de cabra (1:10; R&D Systems) o anti SSEA-1 de ratón conjugado con FITC y anti CD44 de ratón conjugado con PE (1:15; BD Biosciences) durante 30 minutos a 4 °C, clasificado y analizado (FACS Aria, BD Biosciences) usando el modo de clasificación de una sola célula y la Unidad Automatizada de Deposición Celular (ACDU). El FACS Aria estaba equipado con 488, 633 y láser violeta. Las células fueron identificadas y controladas electrónicamente en señales de dispersión de luz directa y ortogonal (FSC y SSC) y firmas fluorescentes (FITC o PE) en una población separada basada en la expresión de CD44, SSEA-1 o EphA2. La fluorescencia de fondo se estimó sustituyendo anticuerpos primarios con controles específicos de isotipo. La medición de la autofluorescencia también se realizó de forma rutinaria para cada condición probada. Los datos sin procesar del instrumento se almacenaron electrónicamente para su archivo y procesamiento de datos.

Clonación de cultivos

Para ensayos clonogénicos, diferentes placas de suspensión de células individuales purificadas con EphA2 derivadas de la disociación de GBM humano y células de propagación de tumores primarios de tejido cerebral normal o células agudamente aisladas), así como del cerebro de un ratón o de células madre neuronales normales humanas establecidas se sembraron en pocillos individuales mediante FACS automatizados y cultivados como neuroesferas. El número de esferas secundarias generadas se evaluó después de 7 DIV (Vescovi et al. (1999), "Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human 5CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation", *Experimental Neurology* **156**, 71-83).

Ejemplo 2.

Inmunohistoquímica

Las muestras de tejido de hGBM, cerebro norma humano y de ratón se fijaron posteriormente en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 24 horas y se colocó en una solución de sacarosa a concentraciones decrecientes a partir del 30 %. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y la inmunohistoquímica se realizaron en secciones de criostato de 10 µm de espesor embebidas en OCT (Galli et al., 2004; Vescovi et al., 1999). Las secciones de tejido se tiñeron durante la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en suero de cabra normal al 10% (NGS; Gibco, Rockville, Maryland, EE.UU.): clon D7 anti-EphA2 (1:200; Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.), anti-SSEA1 de ratón y anti-CD44 de ratón (1:100; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Se empleó después anti-AlexaFluor488/546 de ratón en cabra (1:2000; Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los núcleos celulares se contratiñeron con TO-PRO-3 (Molecular Probes, Invitrogen). Los controles negativos se obtuvieron omitiendo el anticuerpo primario. Las muestras se fotografiaron con el microscopio Zeiss Axioplan2 y el microscopio confocal Leica DMIRE2.

Ejemplo 3.

Evaluación de tumorigenicidad por implantación ortotópica

Para ensayos de iniciación tumoral, las muestras primarias del tumor se desglosaron y se obtuvo una suspensión unicelular tal como se describió anteriormente. Se inyectaron 3 µl de 2x10⁴ células/µl de diferentes fracciones celulares purificadas con EphA2 mediante estereotaxis en el cuerpo estriado derecho de ratones Scid/bg tal como se describió anteriormente (Galli et al., (2004), "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma", *Cancer Res* **64**, 7011-7021). Para el enfoque de dilución limitante, se inyectaron ortotópicamente 1x10⁴, 2x10⁴ y 4x10⁴ fracciones de células no cultivadas disociadas de tumor, purificadas con EphA2, EphA2 SSEA-1 o EphA2 CD44 o 100, 1.000 y 5.000 poblaciones diferentes de CPT purificadas con EphA2.

Todos los resultados de los experimentos *in vivo* se sometieron a análisis estadísticos utilizando el programa informático GraphPad Prism v5.0. Las curvas de supervivencia se estimaron utilizando el método de Kaplan-Meier, con grupos comparados por la supervivencia media respectiva del número de días que se tarda en alcanzar el 50 % de morbilidad. Las distribuciones de supervivencia se compararon mediante la prueba de log-rank. Se consideró un p-valor <0,05 estadísticamente significativo. La frecuencia estimada de células iniciadoras de tumores se determinó de acuerdo con los métodos publicados (Hu y Smyth, (2009), "ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays", *J. Immunol. Methods* **347**, 70-78).

Ejemplo 4.

Infección lentivírica de CPT

Las células se infectaron con el gen indicador de luciferasa de luciérnaga (Amendola et al., (2005), "Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters", *Nat Biotechnol* **23**, 108-166). El título de expresión del vector se estimó en células Hela limitando la dilución. Las partículas del vector se midieron mediante inmunocaptura de antígeno p24 del gag del VIH-1. La infectividad del vector se calculó como la proporción

entre el título y la partícula para cada vector. Las CPT se expusieron durante 16 h al sobrenadante, acondicionado por células 293T transfectadas durante la noche. Luego se eliminó el medio que contenía el virus y se reemplazó por medio nuevo. La eficacia de la infección se evaluó por análisis Lumina *in vivo*. Las células bioluminiscentes se diluyeron en serie de 5000 a 100 células en medio de cultivo en placas negras de fondo claro de 96 pocillos. La D-luciferina (ONE-Glo, el sistema de ensayo de luciferasa, Promega) se añadió a 1:1 (v/v) a cada pocillo 3 minutos antes de la obtención de imágenes. El tiempo de obtención de imágenes fue de 1 min/placa.

Ejemplo 5.

10 Análisis de progresión tumoral *in vivo*

La tumorigenicidad de las CPT, la formación del tumor, la extensión y el volumen se calcularon indirectamente mediante imágenes secuenciales tomadas *in vivo* con el análisis Lumina (Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, EE. UU.). Los animales recibieron el sustrato D-luciferina (Caliper Life Sciences) mediante inyección intraperitoneal a 150 mg/kg 15 min antes de la obtención de imágenes y luego se anestesiaron (isofluorano al 2,5 %) (Jenkins et al., (2005) "Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive *in vivo* detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice", *Breast Cancer Res* 7, 444-454). Los ratones se colocaron en el escenario calentado dentro de la caja de la cámara hermética a la luz con exposición continua de isofluorano al 2 %. Las medidas luminiscentes se realizaron una vez por semana. El sistema de cámara IVIS TM detectó los bajos niveles de luz emitidos por los tumores bioluminiscentes, se integraron, se digitalizaron y se exhibieron. Las barras de escala de pseudocolor fueron consistentes para todas las imágenes de vistas dorsales para mostrar cambios relativos en el sitio del tumor a lo largo del tiempo. La región de interés (ROI) de las imágenes mostradas se identificó alrededor de los sitios del tumor y se cuantificó como flujo total (fotones/s/cm²) utilizando el programa informático Living Image (Xenogen, Caliper Life Sciences).

25 De la descripción anterior y los ejemplos mencionados anteriormente, la ventaja obtenida por el método descrito y obtenido según la presente invención es evidente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una población aislada de células madre tumorales de mamíferos enriquecidas en células madre cancerosas (CMC) o células propagadoras de tumores (CPT) que comprende las etapas de:
- 5
- a. obtener una población de células proporcionadas a partir de una muestra de tejido, en donde la muestra de tejido es una muestra de tumor cerebral;
 - 10 b. separar las células que expresan EphA2 mediante la clasificación celular, de acuerdo con su nivel de expresión EphA2, de la población de células de la etapa a, en donde una fracción EphA2high de la población de células muestra una mayor capacidad de propagación del tumor que una fracción EphA2low de la población de células; y
 - 15 c. seleccionar las células de la fracción EphA2high separadas en la etapa b.,
produciendo así una población de células madre tumorales de mamíferos enriquecidas en células madre cancerosas o células propagadoras de tumores (CPT).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha muestra de tejido de la etapa a. es una biopsia cerebral.
- 20
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha etapa de selección b. se lleva a cabo mediante clasificación celular activada por fluorescencia.
- 25
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho nivel de expresión de EphA2 se mide con un anticuerpo anti-EphA2.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células madre tumorales de mamífero aisladas en la etapa c. se seleccionan del grupo que consiste en células madre tumorales humanas y de ratón.
- 30
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las células madre tumorales son células madre tumorales cerebrales, preferentemente células madre de glioblastoma humano multiforme.
- 35
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho EphA2 es un marcador de superficie de células madre.
8. Uso de EphA2 como marcador de superficie celular para la identificación y el aislamiento de una célula madre tumoral de mamífero, en donde una célula madre tumoral con alta expresión de EphA2 tiene mayor capacidad de propagación del tumor que una célula madre tumoral con baja expresión de EphA2.
- 40
9. El uso según la reivindicación 8, en donde dicha célula madre tumoral de mamífero es una célula madre tumoral humana.
- 45
10. El uso según la reivindicación 8, en donde dicha célula madre tumoral de mamífero es una célula madre tumoral de ratón.
11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde dicha célula madre tumoral es una célula madre tumoral cerebral.
- 50
12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde dicha célula madre de tumor cerebral es una célula madre multiforme de glioblastoma.

FIGURA 1A

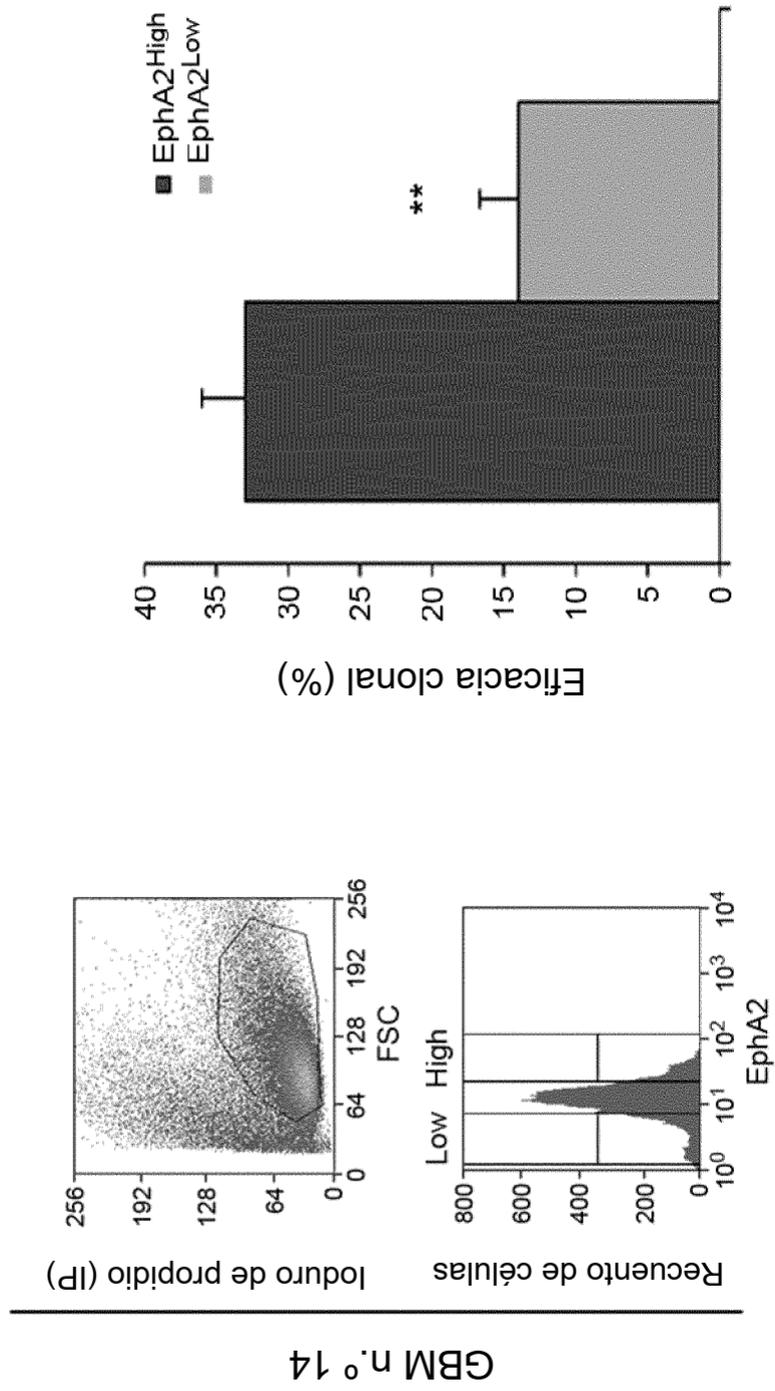


FIGURA 1B

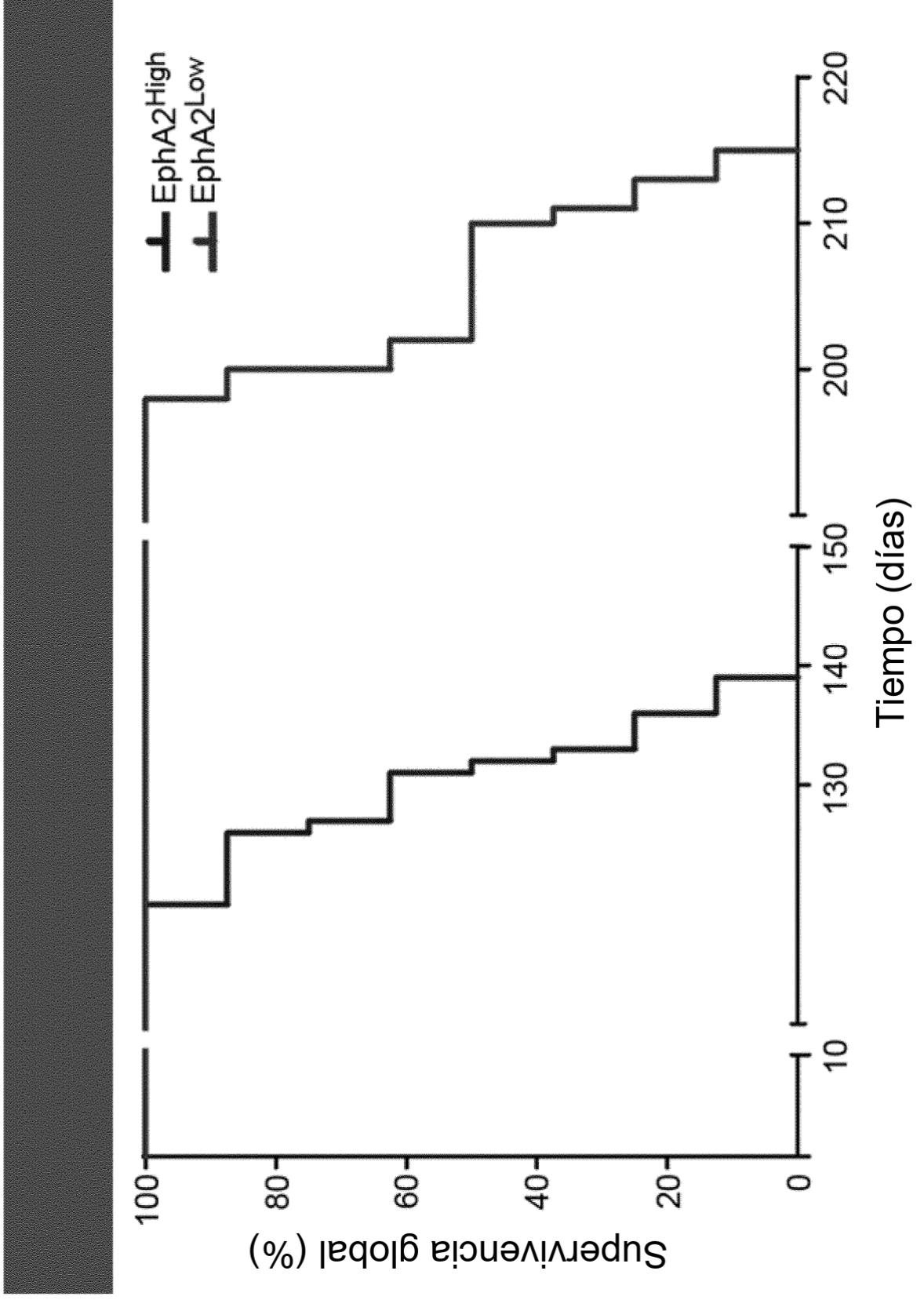


FIGURA 1C

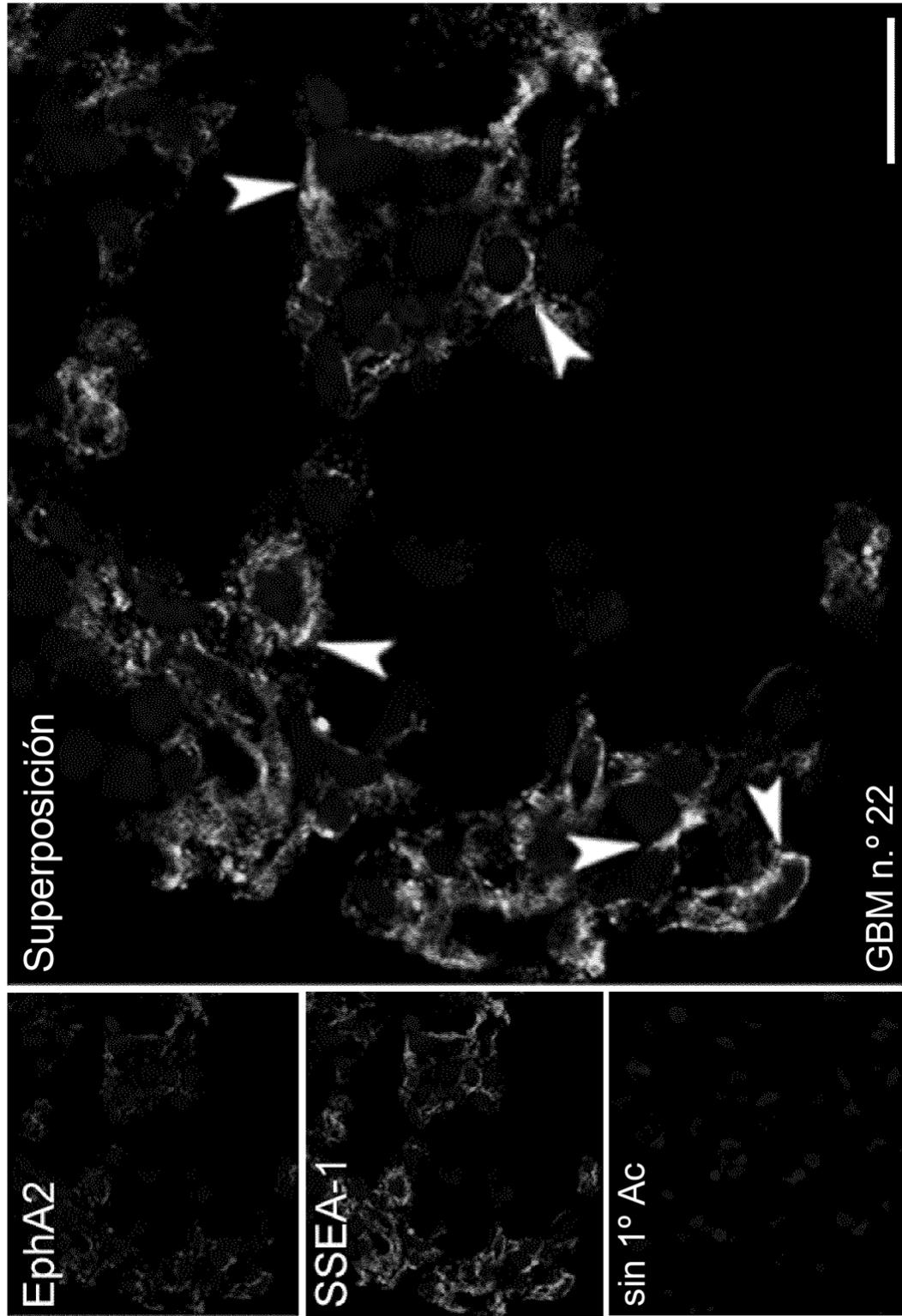


FIGURA 1D

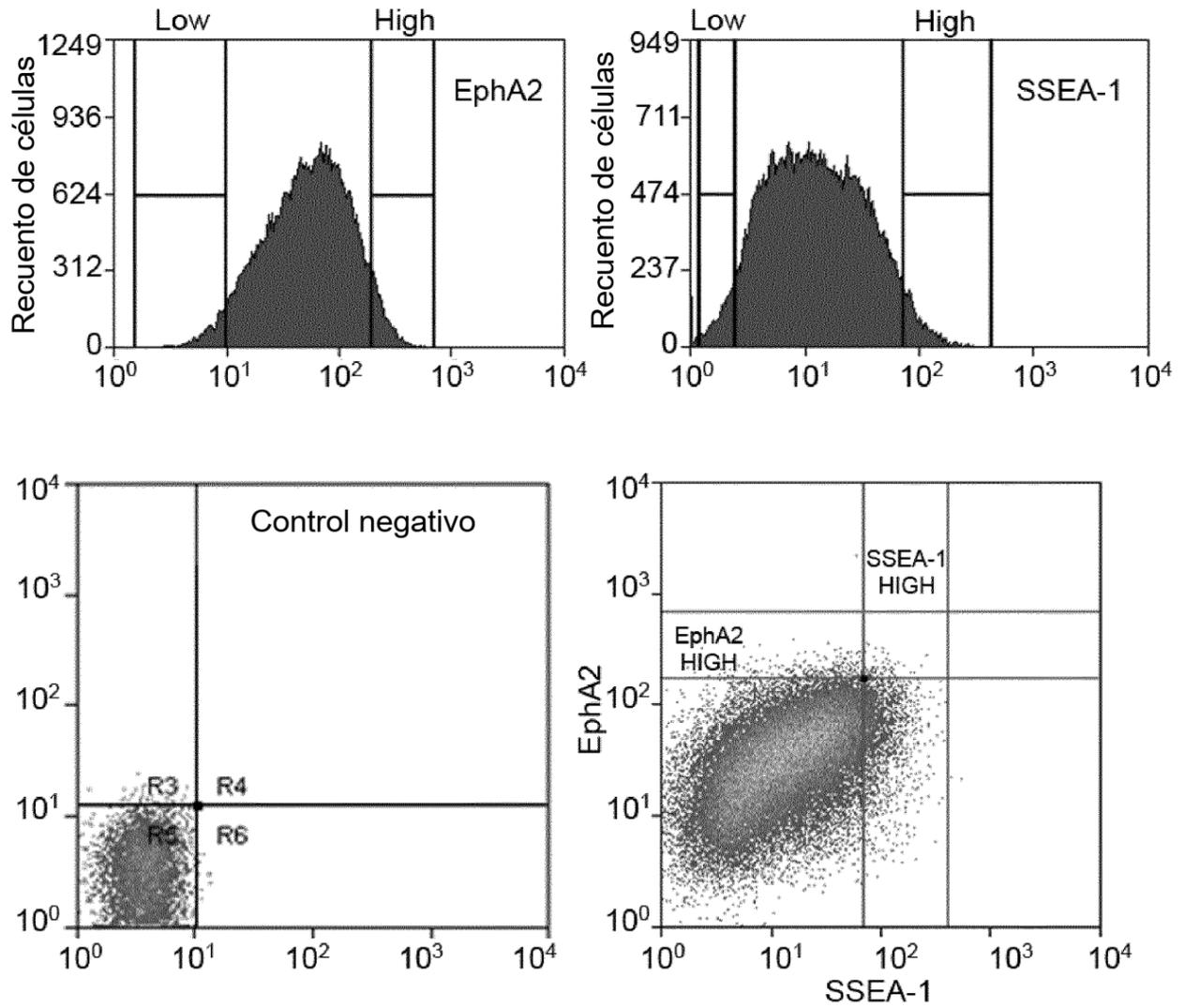


FIGURA 1E

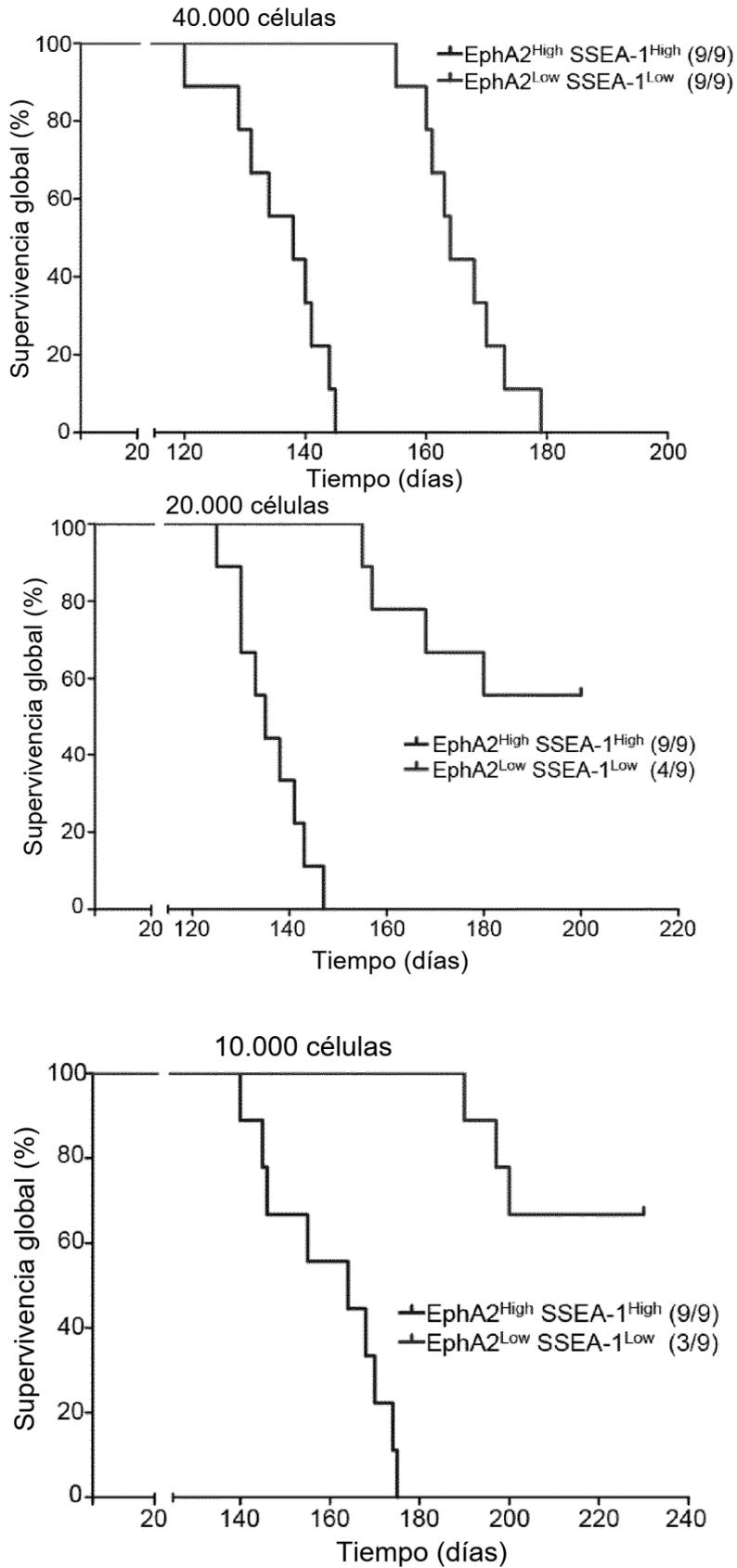


FIGURA 1F

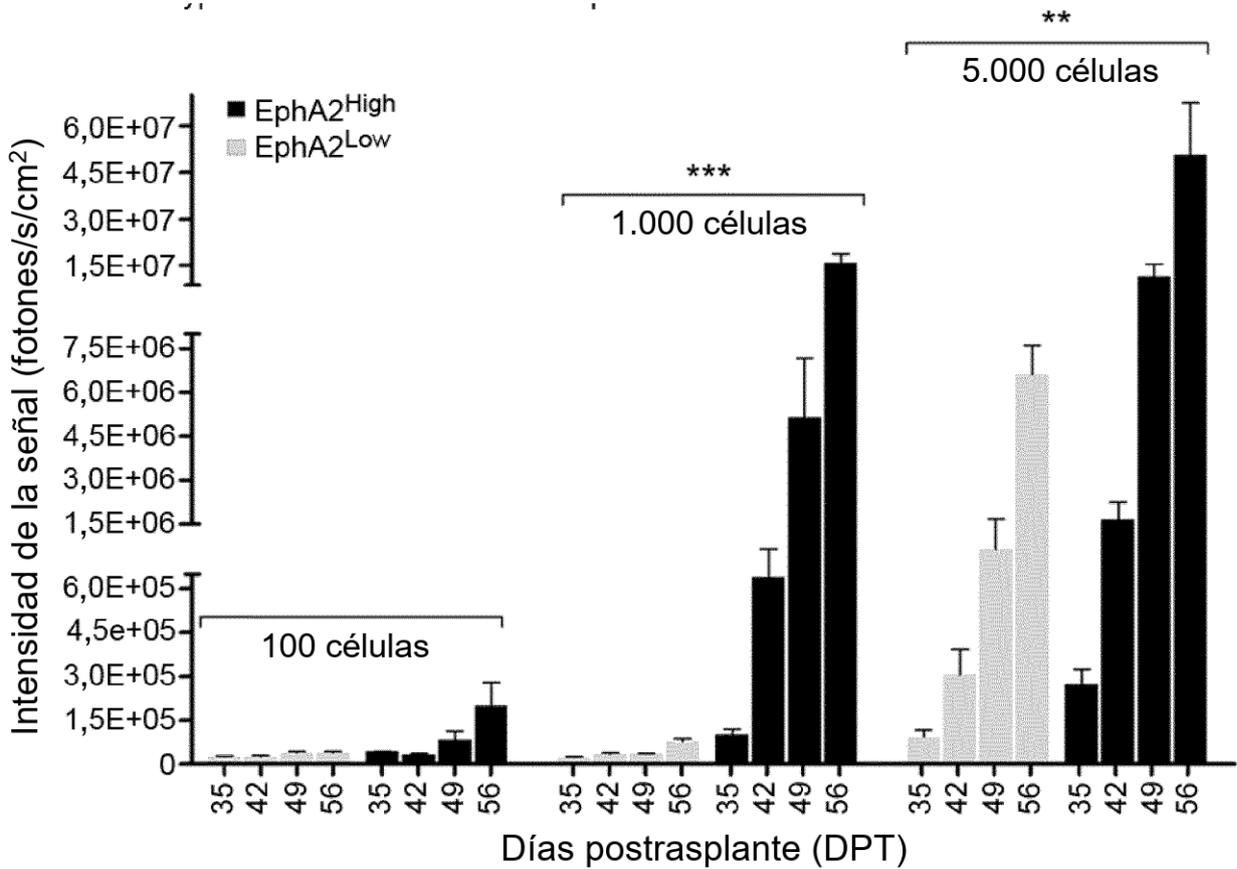
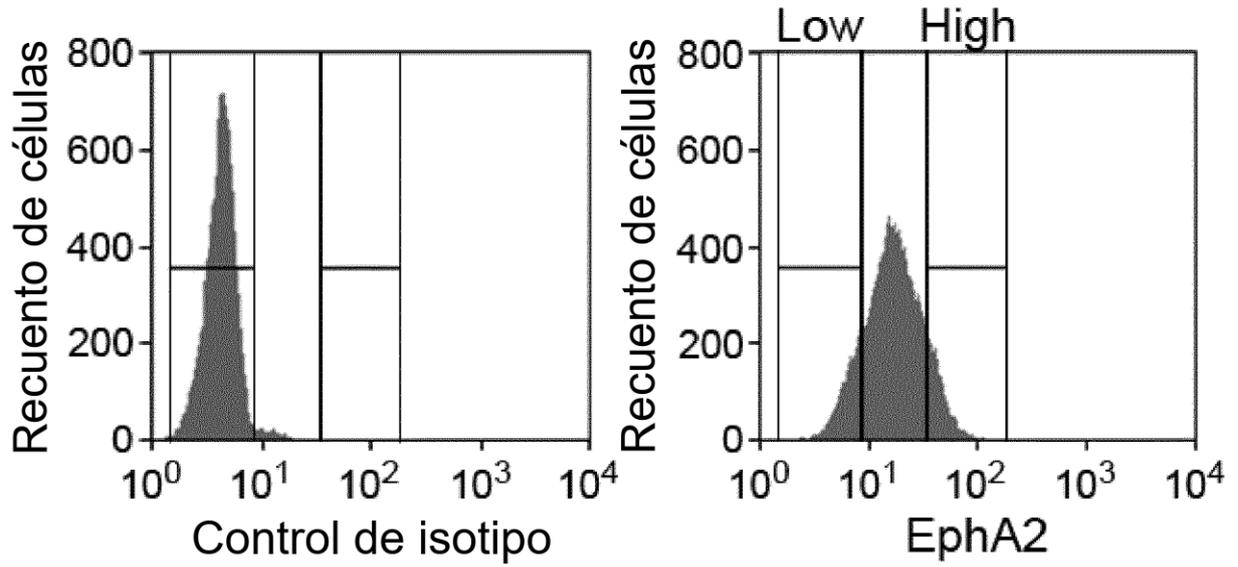


FIGURA 1G

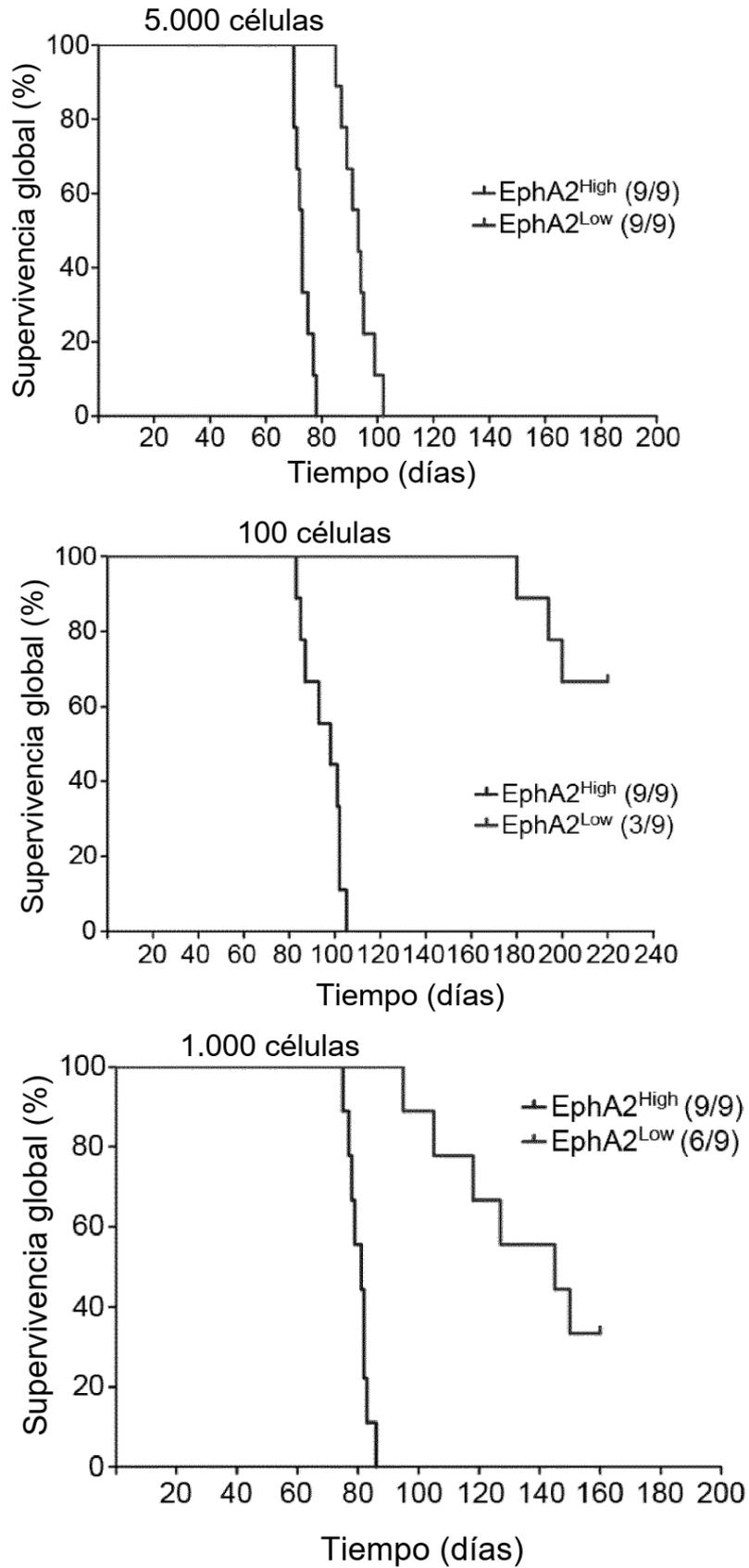
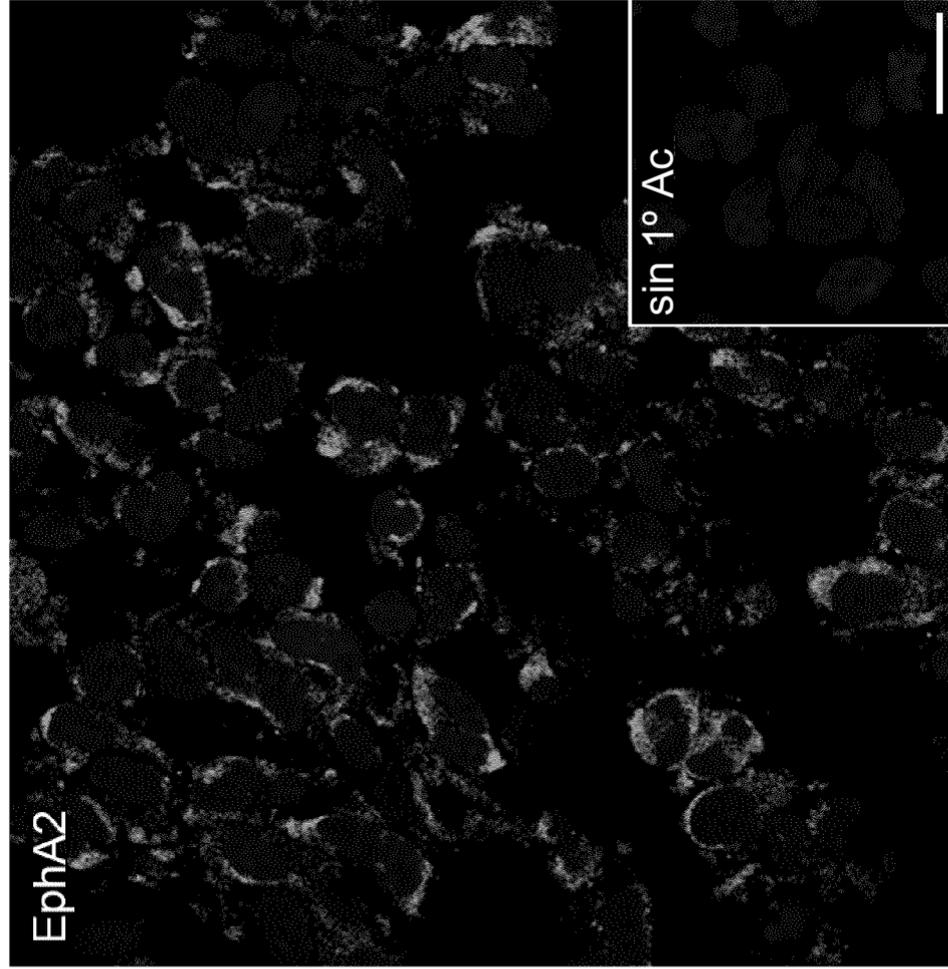


FIGURA 2A

1



GBM n. 23

FIGURA 2B

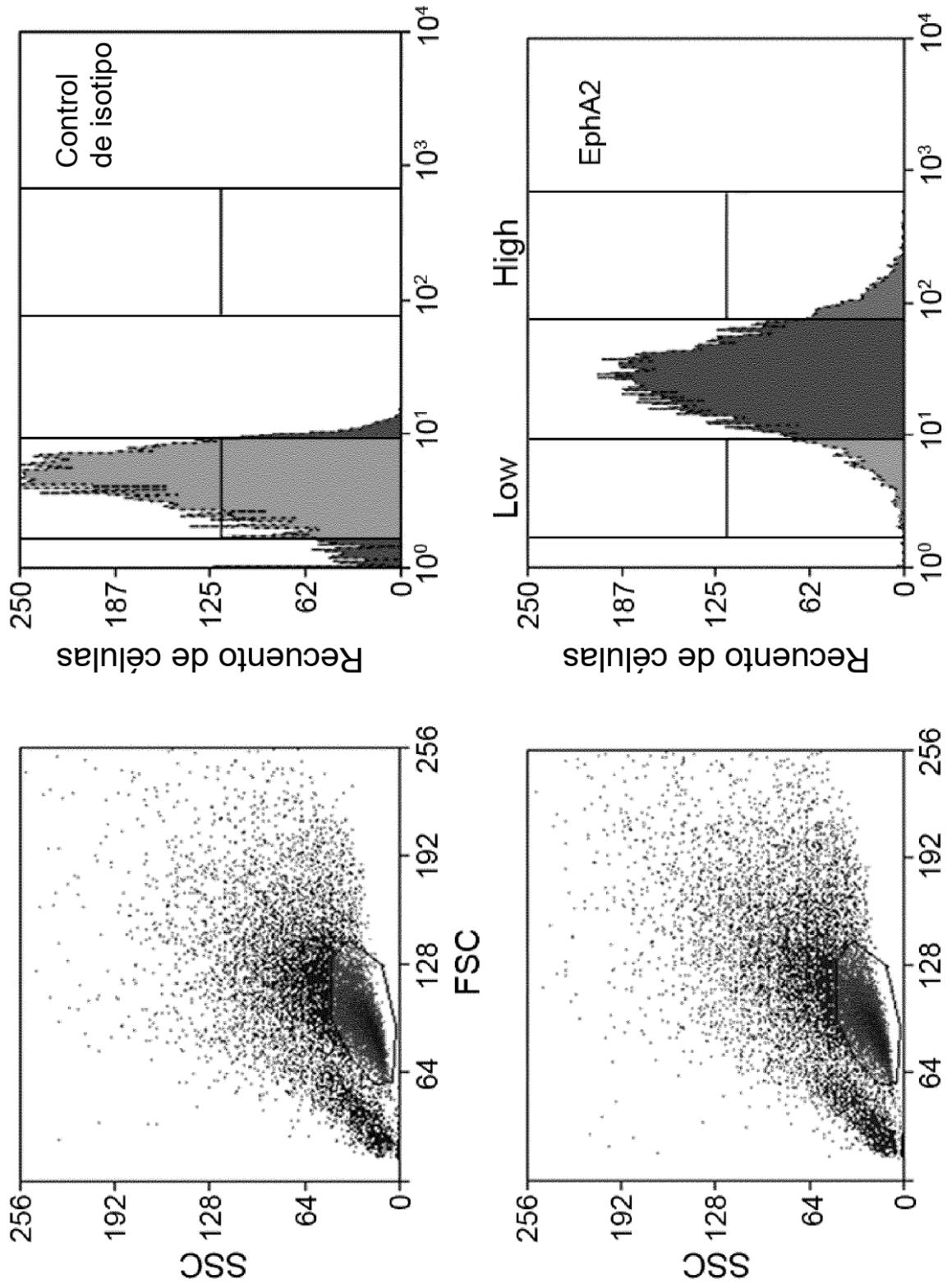


FIGURA 2C

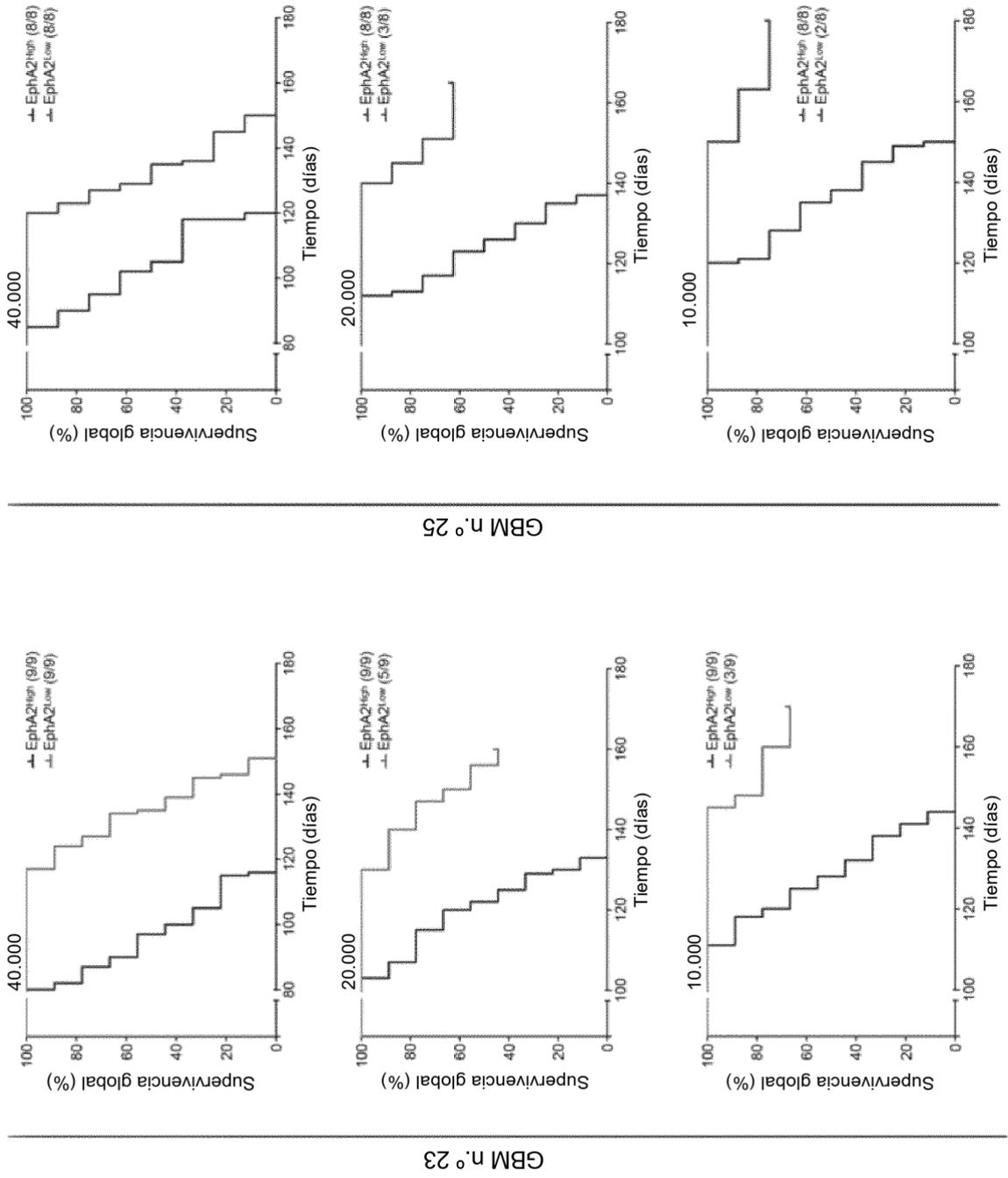


FIGURA 2D

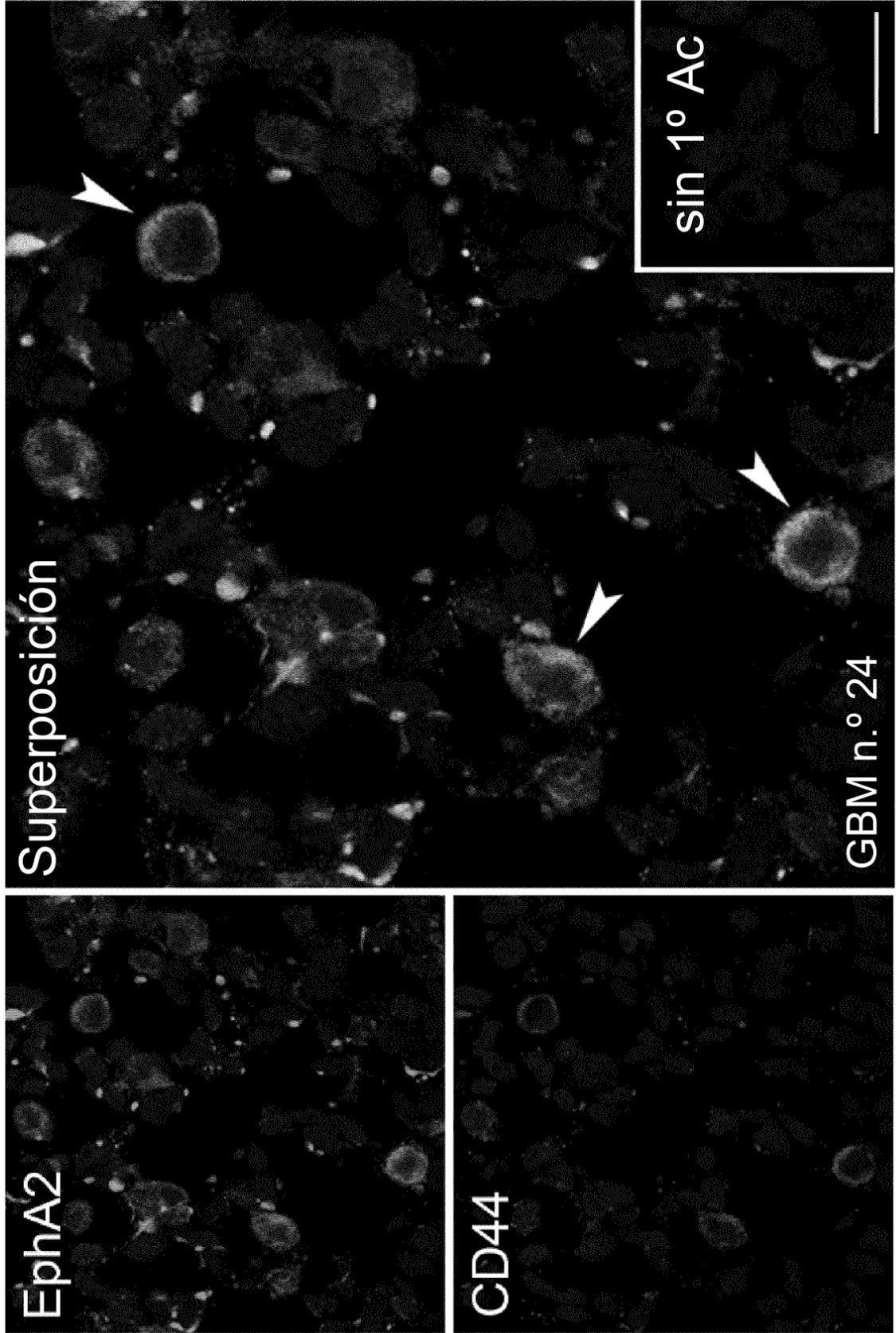


FIGURA 2E

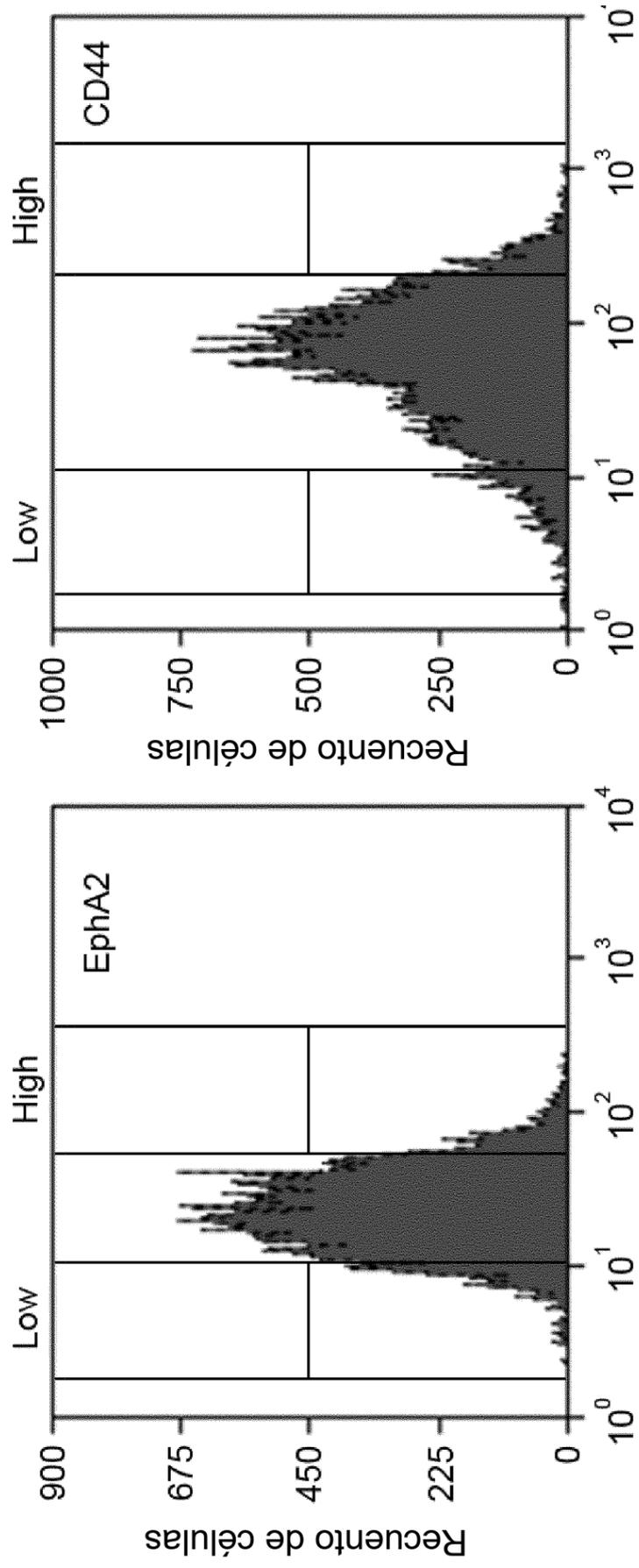


FIGURA 2F

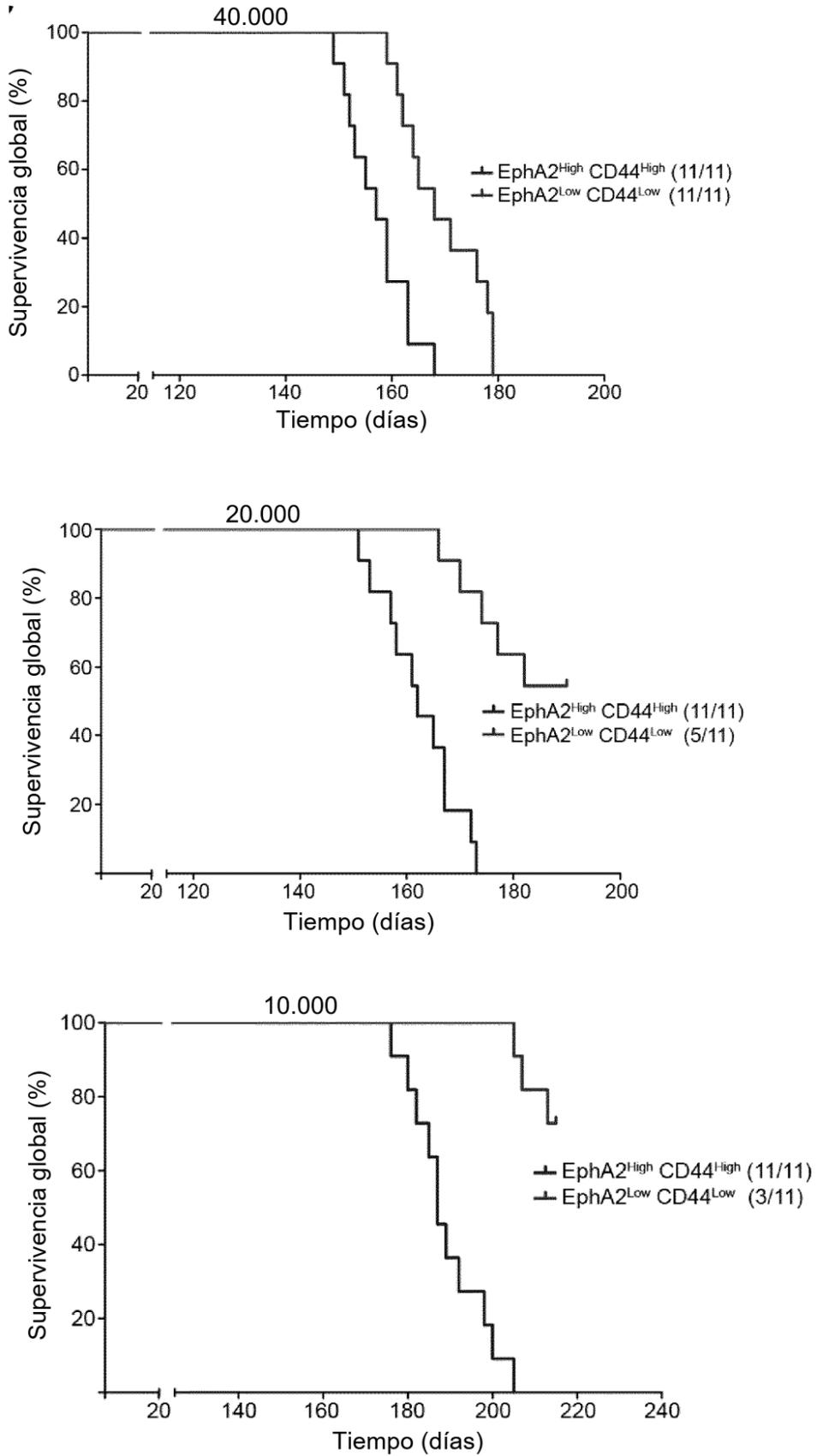


FIGURA 2G

Tejido	Población	Número de tumores/ Número de inyecciones				Frecuencia de células iniciadoras del GBM (intervalo de confianza del 95 %)	Supervivencia media (días)
		Células por inyección					
		40.000	20.000	10.000			
GBM n.º 23	EphA2 ^{High}	9/9	9/9	9/9	1/1	> 1/6961	128
	EphA2 ^{Low}	9/9	5/9	3/9	1/18500	(1/30932-1/11065)	∞
GBM n.º 25	EphA2 ^{High}	8/8	8/8	8/8	1/1	> 1/7411	136
	EphA2 ^{Low}	8/8	3/8	2/8	1/24060	(1/42246-1/13703)	∞
Todos		17/17	17/17	17/17	1/1	> 1/5152	132±5
		17/17	8/17	5/17	1/20943	(1/30580-1/14344)	∞
GBM n.º 22	EphA2 ^{High} / SSEA-1 ^{High}	9/9	9/9	9/9	1/1	> 1/6961	164
	EphA2 ^{Low} / SSEA-1 ^{Low}	9/9	4/9	3/9	1/20820	(1/35015-1/12380)	∞
GBM n.º 24	EphA2 ^{High} / CD44 ^{High}	11/11	11/11	11/11	1/1	> 1/6290	187
	EphA2 ^{Low} / CD44 ^{Low}	11/11	5/11	3/11	1/21696	(1/34806-1/13524)	∞
Todos		20/20	20/20	20/20	1/1	> 1/4813	176±12
		20/20	9/20	6/20	1/21296	(1/30211-1/15011)	∞

FIGURA 3

