

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 796**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
C07K 14/71	(2006.01)	
C07K 16/28	(2006.01)	
C07K 16/30	(2006.01)	
A01K 67/027	(2006.01)	
A61K 39/395	(2006.01)	
C12N 5/095	(2010.01)	
C12Q 1/68	(2006.01)	
G01N 33/50	(2006.01)	
G01N 33/574	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2001 E 01956101 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 1343871**

54 Título: **Aislamiento y uso de células madre de tumores sólidos**

30 Prioridad:

03.08.2000 US 222794 P
13.10.2000 US 240317 P
01.08.2001 US 920517

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2015

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)
1600 Huron Parkway, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48109-2590, US

72 Inventor/es:

CLARKE, MICHAEL F.;
MORRISON, SEAN J.;
WICHA, MAX S. y
AL-HAJJ, MUHAMMAD

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 553 796 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

Aislamiento y uso de células madre de tumores sólidos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Técnica antecedente

10 El cáncer sigue siendo la segunda causa de mortalidad en este país, dando como resultado más de 500.000 muertes al año. Pese a los avances en su detección y tratamiento, la mortalidad del cáncer sigue siendo alta. A pesar del destacable progreso en el entendimiento de la base molecular del cáncer, este conocimiento aún no se ha traducido en estrategias terapéuticas eficaces.

15 En particular, el cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres estadounidenses, desarrollando aproximadamente una de cada nueve mujeres cáncer de mama a lo largo de su vida. Desafortunadamente, el cáncer de mama metastásico sigue siendo una enfermedad incurable. La mayoría de las mujeres con cáncer de mama metastásico sucumben a la enfermedad.

20 Los modos de terapia tradicionales (radioterapia, quimioterapia, y terapia hormonal), aunque son útiles, se han visto limitados por la aparición de células cancerosas resistentes al tratamiento. Claramente, se necesitan nuevas estrategias para identificar dianas para tratar el cáncer de mama metastásico y el cáncer en general.

25 Divulgación de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que un pequeño porcentaje de células en un tumor sólido establecido tienen las propiedades de las "células madre". Estas células "madre" de tumor sólido dan lugar tanto a más células madre de tumor sólido como a la mayoría de las células en el tumor, células cancerosas que han perdido la capacidad de proliferar de manera extensiva y la capacidad para dar lugar a nuevos tumores. Por lo tanto, la heterogeneidad celular de los tumores sólidos refleja la presencia de diversos tipos celulares tumorales que surgen de una célula madre de tumor sólido.

35 El fracaso anterior de las terapias para el cáncer para mejorar significativamente el resultado se debe en parte a la incapacidad de estas terapias para dirigirse a las células madre de tumores sólidos dentro de un tumor que tienen la capacidad de proliferar de manera extensiva y la capacidad para dar lugar a todos los demás tipos celulares de tumores sólidos. La presente invención proporciona una forma para dirigir las terapias anti-cáncer, tanto de manera general como ahora de manera específica, contra las células madre de tumores sólidos. Las terapias anti-cáncer dirigidas de la invención dan como resultado, por lo tanto, en respuestas terapéuticas mucho más eficaces y duraderas.

45 Mediante los métodos de la invención, se pueden caracterizar las poblaciones celulares fenotípicamente heterogéneas dentro de un tumor sólido. Las poblaciones de células obtenidas del tumor sólido se aíslan y caracterizan estructuralmente usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). En particular, se puede identificar, aislar, y caracterizar una población celular fenotípicamente distinta dentro de un tumor que tiene las propiedades de las células madre de proliferar de manera extensiva y la capacidad para dar lugar a todos los demás tipos tumorales. Las células madre de tumores sólidos son las células verdaderamente tumorigénicas que son capaces de restablecer un tumor después del tratamiento.

50 En el presente documento se describen ensayos *in vivo* e *in vitro* de función de células madre de tumores sólidos y de función celular por las diversas poblaciones de células aisladas de un tumor sólido. También se describen métodos para usar las diversas poblaciones de células aisladas de un tumor sólido (tal como una población de células enriquecida respecto de células madre de tumores sólidos) para identificar factores que influyan en la proliferación de las células madre de tumor sólido, para analizar poblaciones de células aisladas a partir de tumores sólidos respecto de patrones de expresión génica o patrones de expresión proteica, para identificar nuevas dianas para fármacos anti-cáncer, para predecir la sensibilidad de los tumores de pacientes individuales a regímenes de tratamiento anti-cáncer existentes, para modelar un tratamiento anti-cáncer, para probar nuevos compuestos terapéuticos, para identificar y probar nuevos marcadores diagnósticos, para tratar tumores, para producir células madre de tumor sólido modificadas genéticamente, y para preparar bibliotecas de ADNc y micromatrices de polinucleótidos y polipéptidos a partir de células madre de tumores sólidos.

65 También se describe un método para cultivar de manera consistente células de tumores sólidos *in vivo*, un método para cultivar células de tumores sólidos que están en suspensión de células individuales o en pequeños agregados, un animal quimérico (un modelo de xenoinjerto) en el que pueden establecerse tumores a partir de células primarias de tumores sólidos y en el que pueden ensayarse los tumores sólidos procedentes de estas células de tumores sólidos, y bancos de tumores (lo suficientemente grandes como para llevar a cabo cantidades sustanciales de

bioensayos) procedentes de células madre de tumores sólidos individuales.

También se describen métodos para seleccionar agentes anti-cáncer; para ensayar terapias anti-cáncer; para desarrollar fármacos que se dirijan a nuevas rutas; para la identificación de nuevas dianas terapéuticas anti-cáncer; para la identificación y diagnóstico de células malignas en especímenes de patología; para analizar y ensayar la sensibilidad a fármacos de las células madre de tumores sólidos; para medir factores específicos que predigan la sensibilidad a fármacos; y para la exploración de pacientes (por ejemplo, como adjunto para mamografías). La divulgación proporciona un modelo para analizar la sensibilidad del tumor de un paciente a terapias conocidas; un modelo para la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer; un sistema para establecer un banco de tumores para analizar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer; y un sistema para identificar a las células cancerosas tumorigénicas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra dos modelos de heterogeneidad de tumores sólidos. En el modelo clásico (FIG. 1A), las mutaciones o las diferencias ambientales hacen que las células tumorales adopten diversos fenotipos diferentes. Las diferencias en el fenotipo determinadas ambientalmente, representadas por células blancas, verdes, y rojas, pueden ser reversibles mientras que los cambios en el fenotipo determinados por mutaciones, representados por células de color púrpura, pueden no ser reversibles. Se cree que muchas células con diversos diferentes fenotipos pueden tener el potencial de proliferar de manera extensiva y de formar nuevos tumores. El modelo de célula madre tumoral (FIG. 1B) se distingue por tener solo una población menor de células tumorales que son tumorigénicas (células amarillas). Estas células madre tumorales se caracterizan por un potencial proliferativo indefinido, la capacidad para formar nuevos tumores, y la capacidad para dar lugar a células cancerosas no tumorigénicas heterogéneas que normalmente forman el grueso de un tumor.

La FIG. 2 es un conjunto de gráficas de FACS de células tumorales de cáncer de mama. Se implantaron células tumorales primarias de cáncer de mama extraídas de dos pacientes humanos en ratones. Los tumores resultantes se retiraron del ratón y se elaboraron suspensiones de células individuales. Las células se tiñeron con anti-CD44-PE, anti-520C9-APC, anti-H2K de ratón-FITC (que tiñe a las células de ratón que se infiltran) y yoduro de propidio (PI, que tiñe a las células muertas). Se aislaron células humanas CD44⁺ y células humanas CD44⁻ vivas y se usaron para estudios *in vitro* e *in vivo*.

La FIG. 3 es un conjunto de gráficas FACS que muestran la expresión de CD24 por células de mama malignas. Las células se aislaron y tiñeron tal como se describe en la FIG. 2. Las células de ratón y las células muertas se eliminaron del análisis en la clasificación. Se muestran las gráficas de FACS de tres tumores de cáncer de mama. Nótese que las células de los tres tumores tienen un fenotipo similar.

La FIG. 4 es un conjunto de gráficas de FACS que muestran un análisis de tumores que surgen de la población celular CD24⁻ de cánceres de mama humanos. De acuerdo con el modelo de célula madre de tumor sólido, las células CD24⁻ dan lugar a tumores que contienen células tanto CD24⁺ como CD24⁻. Por consiguiente, se efectuaron trasplantes usando células B38.1⁺CD24⁻ (FIG. 4 A). Se extirparon los tumores resultantes y se volvieron a analizar las células respecto de la expresión de B38.1 y CD24. Tal como se predijo en el modelo de célula madre, las células obtenidas de un tumor que surge a partir de células B38.1⁺CD24⁻ trasplantadas fueron heterogéneas respecto de la expresión tanto de B38.1 como de CD24 (FIG. 4 B). El patrón de expresión de marcadores de las células aisladas del tumor iniciado por las células B38.1⁺CD24⁻ fue similar al del tumor original (FIG. 4).

La FIG. 5 es una gráfica de FACS que muestra un análisis de la expresión de Notch 4. Las células se aislaron de un tumor de xenoinjerto de ratón (véase más adelante) y se tiñeron con anticuerpos. Las células malignas se analizaron respecto de la expresión de B38.1 y Notch 4. Las células de ratón y las células muertas se eliminaron del análisis en la clasificación.

La FIG. 6 muestra el fraccionamiento de células de cáncer de mama basándose en la expresión de CD44. Las células tumorales T1 (FIG. 6A, FIG. 6C, y FIG. 6E) y las células tumorales T2 (FIG. 6B, FIG. 6D, y FIG. 6F) se tiñeron con anti-CD44-PE, anti-H2K de ratón-FITC y con el colorante de viabilidad 7AAD. Se usó citometría de flujo para aislar células (H2K⁻) humanas que eran bien CD44⁺ (FIG. 6C, FIG. 6D) o CD44⁻ (FIG. 6E, FIG. 6F). Las células muertas (7AAD⁺) se eliminaron de todos los análisis. La FIG. 6A y la FIG. 6B son gráficas de puntos de las células T1 y T2 no fraccionadas que muestran, tal como se indica, expresión de CD44 y H2K. Las gráficas que muestran las poblaciones CD44⁺ (FIG. 6C, FIG. 6D) y CD44⁻ (FIG. 6E, FIG. 6F) aisladas ilustran nuevos análisis de células que se habían aislado mediante citometría de flujo. Estas células se inyectaron en los panículos adiposos mamarios de ratones para examinar su tumorigenicidad. Las tablas 1 y 3 muestran que las células CD44⁺ pero no las CD44⁻ fueron tumorigénicas.

La FIG. 7 muestra el aislamiento de células tumorigénicas. Se usó citometría de flujo para aislar subpoblaciones de células tumorales T1 (FIG. 7A, FIG. 7D, y FIG. 7G), tumorales T2 (FIG. 7 B, FIG. 7E, y FIG. 7F) o tumorales T5 (FIG. 7C, FIG. 7F, y FIG. 7I) que se ensayaron respecto de su tumorigenicidad en ratones NOD/SCID. Las células T1 y T2 se habían pasado una vez en ratones NOD/SCID mientras que las células T5 se obtuvieron de material que se había congelado inmediatamente después de su retirada de un paciente. Las células se tiñeron con anti-B38.1-APC, anti-CD44-PE, anti-CD24-FITC, anti-LINEAGE-citocromo, anti-H2K de ratón-citocromo (solo células T1 y T2), y 7AAD. Las células muertas (7AAD⁺), las células de ratón (H2K⁺) y las células LINEAGE⁺ se eliminaron de todos los análisis. Cada gráfica de puntos ilustra los patrones de tinción de CD24 y CD44 de células B38.1⁺LINEAGE⁻ humanas vivas. La FIG. 7 A, FIG. 7B, y FIG. 7C muestran células tumorales no

fraccionadas. Las células B38.1⁺CD44⁺LINEAGE⁻ que fueron bien CD24^{-/lo} (FIG. 7G, FIG. 7H, FIG. 7I) o CD24⁺ (FIG. 7D, FIG. 7E, FIG. 7F) se aislaron de entre estas células tumorales mediante citometría de flujo. Las FIG. 7D-7I ilustran los nuevos análisis de estas poblaciones clasificadas, que posteriormente se inyectaron en los

5 panículos adiposos mamarios de ratones NOD/SCID para ensayar la tumorigenicidad. La FIG. 7J muestra un tumor representativo en un ratón en el sitio de inyección de B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻, pero no en el sitio de inyección de B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻. La histología efectuada en el tejido de los sitios de inyección de CD24⁺ (FIG. 7 K, aumento del objetivo 20x) y de CD24^{-/lo} (FIG. 7L, aumento del objetivo 40x) mostraron tejido normal de ratón y células malignas, respectivamente.

La FIG. 8 muestra el enriquecimiento de células tumorigénicas basándose en la expresión de ESA. Se usó citometría de flujo para aislar subpoblaciones de células tumorales T1 que se ensayaron respecto de su tumorigenicidad en ratones NOD/SCID. Las células T1 se habían pasado una vez en ratones NOD/SCID. Las células se tiñeron con anti-B38.1-APC, anti-CD24-PE, anti-ESA-FITC, anti-LINEAGE-citocromo, anti-H2K de

10 ratón-citocromo (T1), y 7AAD. Las células muertas (7AAD⁺), las células de ratón (H2K⁺) y las células LINEAGE⁺ se eliminaron de los análisis. La gráfica de puntos en la FIG. 8A ilustra el patrón de tinción de CD24 y de ESA de células B38.1⁺LINEAGE⁻ humanas. La población tumorigénica se encuentra recuadrada y marcada con una flecha. En la FIG. 8 B, las células ESA⁺B38.1⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ (panel izquierdo) y las células LINEAGE⁻ H2K⁻ restantes (panel derecho) se recogieron usando citometría de flujo.

La FIG. 9 es el resultado de un ensayo clonogénico *in vitro*. Se usó citometría de flujo para aislar células tumorigénicas el resto de las neoplásicas no tumorigénicas (células no tumorigénicas) del modo descrito. Las células se situaron en medio de cultivo tisular que contenía Delta soluble durante el número de días indicado. Las células tumorigénicas y no tumorigénicas de xenoinjertos de Tumor 1 (T1) (FIG. 9A), Tumor 4 (T4) (FIG. 9B) o de

20 paciente primario (FIG. 9C) se muestran en el momento indicado después de situarlas en cultivo tisular. Las células T4 se tiñeron con colorante de Papanicolau y se examinaron con un microscopio óptico (objetivo 100x). Nótese que las poblaciones tanto no tumorigénicas (FIG. 9D) como tumorigénicas (FIG. 9E) consisten en células neoplásicas con núcleos grandes y nucléolos prominentes. Nótese que el número de células que se unieron a la placa de cultivo tisular fue similar en ambas poblaciones, pero la población tumorigénica dio siempre lugar a colonias. Las poblaciones no tumorigénicas no dieron lugar a colonias establecidas (o solo durante periodos breves, de aproximadamente 2-6 días).

La FIG. 10 es un conjunto de gráficas de puntos que muestra la diversidad fenotípica en los tumores que surgen a partir de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻. Las gráficas de puntos ilustran los patrones de tinción de CD24 y CD44 de células LINEAGE⁻ humanas vivas de Tumor T1 (FIG. 10A - FIG. 10C) o Tumor T2 (FIG. 10D - FIG. 10F). La FIG. 10 A y la FIG. 10D muestran células T1 o T2 no fraccionadas obtenidas de tumores que se han pasado una vez en ratones NOD/SCID. Las células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ de T1 (FIG. 10B) o T2 (FIG. 10E) se aislaron tal como se describe en la FIG. 2, anterior. Las poblaciones B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ analizadas de nuevo en la FIG. 10 B y la FIG. 10E se inyectaron en los panículos adiposos

35 mamarios de ratones NOD/SCID. La FIG. 10C y la FIG. 10F ilustra los análisis de los tumores que surgieron a partir de estas células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻. Nótese que en ambos casos, las células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ formaron tumores que contenían una población de células fenotípicamente diversas similar a la observada en el tumor original.

La FIG. 11 muestra la expresión de HER2/neu y EGF-R. Se usó citometría de flujo para aislar subpoblaciones de células Tumor T1 que se habían pasado una vez en ratones NOD/SCID. Las células se tiñeron con, en la FIG. 11 A, anti-EGF- R-PE, anti-B38.1-APC, anti-CD24-FITC, anti-LINEAGE-citocromo, anti-H2K de ratón-citocromo, y 7AAD o, en la FIG. 11B anti-HER2/neu-FITC, anti-B38.1-APC, anti-CD24-PE, anti-LINEAGE-citocromo, anti-H2K de ratón-citocromo, y 7AAD. Las células muertas (7AAD⁺), las células de ratón (H2K⁺) y las células LINEAGE⁺ se eliminaron de todos los análisis. El histograma en la FIG. 11A ilustra la expresión de EGF-R de las células no

45 teñidas (línea de puntos), la población tumorigénica B38.1⁺CD24⁻LINEAGE⁻ (sombreada) y la población no tumorigénica B38⁺CD24⁺LINEAGE⁻ (línea continua). El histograma en la FIG. 11B muestra la expresión de HER2/neu de las células no teñidas (línea de puntos), la población tumorigénica B38.1⁺CD24⁻LINEAGE⁻ (sombreada) y la población no tumorigénica B38⁺CD24⁺LINEAGE⁻ (línea continua). Se llevó a cabo una RT-PCR usando cebadores anidados para detectar EGF-R (FIG. 11C y FIG. 11D) o para detectar HER2/neu (FIG. 11E). Se analizaron una célula por muestra en los paneles FIG. 11D y FIG. 11E o diez células por muestra en el panel FIG. 11C. EGF-R se expresa a niveles menores en células tumorigénicas que en células no tumorigénicas a nivel tanto de proteína (FIG. 11A) como de ARNm (FIG. 11C, FIG. 11D).

La FIG. 12 es una fotomicrografía de células de cáncer de mama puestas en cultivo tisular después de exponerlas a un anticuerpo anti-Notch 4. Las células se incubaron sobre hielo durante una hora en HBSS con o sin Delta soluble pero sin anticuerpo anti-Notch 4, con anticuerpo anti-Notch 4, o con anticuerpo anti-Notch 4 que se había preincubado con el péptido usado para generar el anticuerpo. Se muestra el número de colonias que se formaron en los experimentos triplicados. Se añadió Delta soluble al cultivo. Se añadió al cultivo medio de control de Fc con Delta soluble. Símbolos: Ab = el anticuerpo anti-Notch 4; Bloque = el péptido usado para generar el anticuerpo anti-Notch 4.

60

La FIG. 13 es un diagrama esquemático de las células B38.1⁺ en un tumor. Las células madre de cáncer de mama de diversos pacientes son B38.1⁺. Para tratar con éxito un cáncer con una estrategia de terapia génica, pueden usarse estas células como diana de un vector.

La FIG. 14 es una descripción del método para obtener el conjugado biespecífico y de las modificaciones químicas introducidas en los anticuerpos.

65

La FIG. 15 es una estrategia para redirigir adenovirus. El virus LaZ puede infectar a la mayoría de las células de un tumor. Después de incubar al virus LaZ con el anticuerpo anti-fibra, el virus LaZ pierde la capacidad para infectar a todas las células. Después de incubar al virus LaZ con el conjugado biespecífico, el resto de B38.1 de la molécula permite la adhesión del virus a las células B38.1⁺, de tal forma que solo estas células se infectan.

La FIG. 16 muestra el direccionamiento a las células madre de cáncer de mama con el anticuerpo biespecífico. Se infectaron diferentes líneas celulares con AdLaZ, que es un adenovirus con E1 eliminado que expresa el gen de β -galactosidasa (columnas de color gris, control para infección vírica). En algunos casos, el virus se incubó con el anticuerpo anti-fibra durante 30 min antes de la infección (columnas de color amarillo). En otros casos, el virus se incubó con el conjugado biespecífico (columnas de color verde). A las 24 h después de la infección, se fijaron e incubaron las monocapas con tampón que contenía X-Gal. Las células infectadas son de color azul, y la gráfica muestra el porcentaje de células azules obtenidas, en relación al control de infección (es decir, la reducción o el aumento en la infectividad del virus después de la incubación con los diferentes anticuerpos).

La FIG. 17 muestra que el anticuerpo biespecífico puede dirigir a un vector adenoviral a células madre de cáncer de mama. Las columnas representan el número absoluto de células infectadas por campo. Gris: Las células indicadas están infectadas con el adenovirus de control. Amarillo: las células indicadas se infectaron con el adenovirus que se había incubado con el anticuerpo anti-fibra. Verde: Las células indicadas se incubaron con el anticuerpo conjugado biespecífico. Rojo: Las células se infectaron con el virus que se había infectado con el anticuerpo conjugado biespecífico, pero las células se habían tratado previamente con un exceso de anticuerpo de B38.1.

La FIG. 18 es una fotografía de algunas de las monocapas celulares después de la tinción con X-Gal. Las células infectadas aparecen como puntos oscuros en esta imagen en blanco y negro (el gen de β -galactosidasa del virus LaZ tiene una señal de localización nuclear). La tinción se produce en el núcleo de las células.

La FIG. 19 es un análisis de diferentes poblaciones de células en un cáncer de mama. Las células madre de cáncer de mama $\text{ESA}^+\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{lo}}\text{LINEAGE}^-$ (FIG. 19A) y las células $\text{ESA}^+\text{CD44}^+\text{CD24}^+\text{LINEAGE}^-$ no tumorigénicas (FIG. 19B) se obtuvieron tal como se describe en la FIG. 8. Las células se tiñeron con Hoechst 33342 tal como describen Eaves y colaboradores (Glimm H. et al., Blood. 96(13): 4185-93 (2000)). El histograma para las células madre de cáncer de mama se encuentra sombreado. Nótese que las células madre de cáncer de mama y las células no tumorigénicas se encuentran distribuidas en todas las fases del ciclo celular.

La FIG. 20 es un análisis adicional de diferentes poblaciones de células en un cáncer de mama. Las células madre de cáncer de mama $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{lo}}\text{LINEAGE}^-$ y las células $\text{CD44}^+\text{CD24}^+\text{LINEAGE}^-$ no tumorigénicas se obtuvieron tal como se describe en la FIG. 7. Las células se tiñeron con Rodamina 123 tal como describen Spangrude et al., Blood 85(4):1006-16, 1995). El histograma para las células madre de cáncer de mama se encuentra sombreado. Nótese que las células madre de cáncer de mama tienden a teñirse con menos intensidad con Rodamina 123.

La FIG. 21 es un análisis de fluido de ascitis para células madre de cáncer de ovario. Las células se tiñeron con anti-B38.1-APC, anti-CD44-PE, anti-CD24-FITC, anti-Lineage-citocromo y 7AAD. Las células muertas (7AAD⁺), y las células LINEAGE^+ se eliminaron de los análisis. Nótese que hay una población distinguible de células $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{lo}}\text{LINEAGE}^-$ que se asemeja a las células madre de cáncer de mama.

La FIG. 22 es un análisis de células de sarcoma para células madre de tumor sólido. Las células P1 de sarcoma que crecen en el modelo de xenoinjerto se tiñeron con anti-B38.1-APC, anti-CD44-PE, anti-CD24-FITC, anti- LINEAGE -citocromo, anti-H2K-citocromo y 7AAD. Las células muertas (7AAD⁺), las células LINEAGE^+ y las células de ratón se eliminaron de los análisis. Nótese que el cóctel de linaje en este análisis no incluyó CD10, CD31 o CD140b. Nótese también que hay una población distinguible de células $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{lo}}\text{LINEAGE}^-$.

Modos para llevar a cabo la invención

Células madre y modelos de heterogeneidad de tumores sólidos. Los tumores sólidos están compuestos de poblaciones celulares heterogéneas. Por ejemplo, los cánceres de mama son una mezcla de células cancerosas y de células normales, que incluyen células mesenquimales (estromales), células inflamatorias, y células endoteliales. Los modelos clásicos sostienen que todas las poblaciones de células cancerosas fenotípicamente distintas tienen la capacidad de proliferar y dar lugar a un nuevo tumor (FIG. 1 A). En el modelo clásico, la heterogeneidad de células tumorales es el resultado de factores ambientales así como de mutación continua en células cancerosas que dan como resultado poblaciones diversas de células tumorigénicas y todas las poblaciones de células podrían tener un potencial tumorigénico similar. Pandis et al., Genes, Chromosomes & Cancer 12: 122-129 (1998); Kuukasjarvi et al., Cancer Res. 57: 1597-1604 (1997); Bonsing et al., Cancer 71: 382-391 (1993); Bonsing et al., Genes Chromosomes & Cancer 82:173-183 (2000); Beerman H et al., Cytometry. 12(2): 147-54 (1991); Aubele M y Werner M, Analyt. Cell. Path. 19: 53 (1999); Shen L et al., Cancer Res. 60: 3884 (2000)).

La presente invención se basa en un modelo alternativo de heterogeneidad celular en tumores sólidos, en el que un tumor sólido es el resultado de una "célula madre de tumor sólido" (o "célula madre cancerosa" de un tumor sólido) y el posterior desarrollo caótico de la célula madre de tumor sólido. En este modelo de célula madre (FIG. 1 B), los tumores contienen un subconjunto distinguible y limitado (o posiblemente raro) de células que comparten las propiedades de las "células madre" normales, en tanto que proliferan de manera extensiva o indefinidamente y en que dan lugar de manera eficaz a células madre de tumor sólido adicionales. Dentro de un tumor sólido establecido, la mayoría de las células han perdido la capacidad para proliferar de manera extensiva y formar nuevos tumores, pero las células madre de tumores sólidos proliferan de manera extensiva y dan lugar a células madre de tumor

sólido adicionales así como a otras células tumorales que carecen de potencial tumorigénico. Es esta población de células madre de tumor sólido la que prolifera y en última instancia demuestra ser fatal.

Para distinguir entre estos modelos, deben superarse las deficiencias de los ensayos clonogénicos anteriores (véase más adelante). Para demostrar la existencia de una población consistente de células madre en vez de una baja probabilidad de tumorigenicidad en cualquier tipo celular, se tiene que ser capaz de purificar las células madre y de demostrar que están elevadamente enriquecidas para tumorigenicidad, mientras que el resto de las células neoplásicas están desprovistas de dicha actividad. La invención proporciona esta capacidad.

La capacidad para aislar y analizar poblaciones de células dentro de un tumor sólido, basándose en características estructurales de las células madre de tumor sólido, descrita en el presente documento, permite a un experto en el campo de la oncología o de la biología de células madre distinguir entre los dos modelos mostrados en la FIG. 1. Mediante la presente invención, se han aislado y analizado células madre de tumor sólido y poblaciones celulares de tumores sólidos. Además, estas células madre de tumor sólido tienen un potencial proliferativo muy elevado o ilimitado, y por lo tanto representan a la población auténticamente tumorigénica. De acuerdo con el modelo de célula madre de tumor sólido y los resultados proporcionados más adelante (véase EJEMPLOS), estas células tumorigénicas son las células clonogénicas de los tumores sólidos.

Durante el desarrollo animal normal, las células de la mayoría o de todos los tejidos proceden de precursores normales, denominados células madre (Morrison et al., Cell 88(3): 287-98 (1997); Morrison et al., Curr. Opin. Immunol. 9(2): 216-21 (1997); Morrison et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11: 35-71 (1995)). En la técnica se entiende que la expresión "célula madre" significa (1) que la célula es una célula capaz de generar uno o más tipos de progenie con potencial proliferativo o de desarrollo reducido; (2) que la célula tiene capacidad proliferativa extensiva; y (3) que la célula es capaz de renovarse a sí misma o de mantenerse a sí misma (véanse Potten et al., Development 110: 1001 (1990); Patentes de Estados Unidos n.º 5.750.376, 5.851.832, 5.753.506, 5.589.376, 5.824.489, 5.654.183, 5.693.482, 5.672.499 y 5.849.553). En animales adultos, algunas células (incluyendo células de la sangre, intestino, sistema ductal mamario y de la piel) se reponen constantemente a partir de una pequeña población de células madre en cada tejido. Por lo tanto, el mantenimiento de los tejidos (ya sea durante la vida normal o en respuesta a lesiones y enfermedades) depende de la reposición de los tejidos a partir de células precursoras en respuesta a señales de desarrollo específicas.

El ejemplo mejor conocido de renovación de células adultas mediante la diferenciación de células madre es el sistema hematopoyético (véanse las Patentes de Estados Unidos n.º 5.061.620, 5.087.570; 5.643.741; 5.821.108; 5.914.108). Los precursores inmaduros en cuanto a su desarrollo (células madre y progenitoras hematopoyéticas) responden a señales moleculares para formar de manera gradual los diversos tipos celulares sanguíneos y linfoides. Las células madre también se encuentran en otros tejidos, incluyendo tejidos epiteliales (véase Slack, Science 287: 1431 (2000)) y tejidos mesenquimales. (Véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.942.225). En el desarrollo mamario normal, una célula madre normal da lugar a una descendencia diferenciada para formar un sistema ductal normal. Kordon y Smith, Development 125: 1921-1930 (1998); véanse también, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.814.511 y 5.650.317.

Mediante la presente invención, se han aplicado los principios de la biología de células madre normales para aislar y caracterizar células madre de tumor sólido. Los ejemplos de tumores sólidos a partir de los cuales pueden aislarse células madre de tumor sólido o enriquecerse respecto de estas de acuerdo con la invención incluyen sarcomas y carcinomas, tales como, pero sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. La invención es aplicable a sarcomas (véase la FIG. 22) y cánceres epiteliales, tales como cánceres de ovario (véase la FIG. 21) y cánceres de mama (véanse los EJEMPLOS).

Las células madre de tumor sólido se definen estructural y funcionalmente tal como se describe en el presente documento; usando los métodos y ensayos similares a aquellos descritos a continuación. Debido a que se sabe que las células tumorales evolucionan fenotípica y funcionalmente a lo largo del tiempo a medida que se originan mutaciones genéticas adicionales, las células madre de tumor sólido pueden cambiar fenotípica y funcionalmente con el tiempo en un paciente individual. Sin embargo, puede usarse el método de la invención, empleando los marcadores divulgados en el presente documento, que son útiles de manera consistente en el aislamiento o identificación de células madre de tumor sólido en una mayoría de pacientes.

Asimismo, las células madre de tumor sólido sufren "auto-renovación" y "diferenciación" en un desarrollo caótico para formar un tumor, dando lugar a tipos celulares anormales, y pueden cambiar con el tiempo a medida que se producen mutaciones adicionales. Las características funcionales de una célula madre de tumor sólido se encuentran en que son tumorigénicas, dan lugar a células tumorigénicas adicionales ("auto-renovación") y pueden dar lugar a células tumorales no tumorigénicas ("diferenciación").

El origen del desarrollo de las células madre de tumor sólido puede variar entre tipos de cánceres de tumor sólido. Las células madre de tumor sólido pueden surgir bien como resultado de un daño genético que desregula la proliferación y diferenciación de células madre normales (Lapidot et al., Nature 367(6464): 645-8 (1994)) o mediante la proliferación desregulada de un progenitor restringido normal o de un tipo celular normal diferenciado. Normalmente, los tumores sólidos se visualizan e identifican inicialmente de acuerdo con sus localizaciones, no mediante el origen de su desarrollo.

Por el contrario, una célula no tumorigénica de un tumor sólido es una célula de una población que no logra formar un tumor palpable después de su trasplante en un ratón inmunocomprometido, en el que si se trasplantase el mismo número de células tumorales no fraccionadas disociadas en las mismas circunstancias, las células madre de tumor sólido formarían un tumor palpable en el mismo periodo de tiempo. Por lo tanto, las células no tumorigénicas están desprovistas de actividad formadora de tumores en un modelo animal.

Los expertos en las artes médicas entienden que un "tumor palpable" es un tumor que puede manipularse, tocarse o percibirse.

Debido a que los cambios tumorigénicos son inherentes a las células madre de tumor sólido, incluso después de que se hayan retirado de su ambiente normal dentro del tumor, la invención proporciona varios nuevos usos:

- (1) mediante la identificación de los genes y proteínas expresados por las células madre de tumor sólido es posible identificar proteínas cuya función sea necesaria para la tumorigénesis y que representan nuevas dianas farmacológicas;
- (2) mediante la purificación de células madre de tumor sólido basándose en marcadores fenotípicos es posible estudiar sus patrones de expresión génica y funciones de una manera mucho más directa y eficaz;
- (3) mediante el desarrollo de ensayos *in vitro* e *in vivo* de la función de las células madre de tumor sólido es posible probar de manera más eficaz los efectos de compuestos terapéuticos potenciales;
- (4) mediante la identificación de marcadores de células madre de tumor sólido es posible diagnosticar de manera más eficaz la presencia de células malignas (incluso aquellas que no dependen de características ambientales raras respecto de su capacidad para producir tumores);
- y
- (5) mediante el aislamiento de células madre de tumor sólido de pacientes individuales y trasplantándolas en ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo* es posible probar la eficacia de diferentes regímenes farmacológicos contra las mismas. Por lo tanto, es posible predecir la sensibilidad a fármacos y la resistencia a fármacos.

Las células madre de tumor sólido del modelo de la invención difiere de la "línea madre de cáncer" proporcionada en la Patente de Estados Unidos 6.004.528. En esa patente, la "línea madre de cáncer" se define como un tipo celular progenitor de crecimiento lento que en sí tiene pocas mutaciones pero que sufre divisiones celulares simétricas en lugar de asimétricas como resultado de cambios tumorigénicos que suceden en el ambiente celular. Esta hipótesis de "línea madre de cáncer" propone, por lo tanto, que las células tumorales altamente mutadas de proliferación rápida surgen en gran medida como resultado de un ambiente anormal, que hacen que las células madre relativamente normales se acumulen y posteriormente sufran mutaciones que hagan que se conviertan en células tumorales. La Patente de Estados Unidos 6.004.528 propone que dicho modelo puede usarse para potenciar el diagnóstico del cáncer. El modelo de célula madre de tumor sólido es fundamentalmente diferente al modelo de "línea madre de cáncer" y por consiguiente muestra utilidades no ofrecidas por el modelo de "línea madre de cáncer". En primer lugar, las células madre de tumor sólido no están "libres de mutaciones". La "línea madre de cáncer libre de mutaciones" descrita en la Patente de Estados Unidos n.º 6.004.528 puede considerarse como una lesión precancerosa, mientras que las células madre de tumor sólida descritas de la presente invención son células cancerosas que en sí contienen las mutaciones que son responsables de la tumorigénesis. Es decir, las células madre de tumor sólido ("células madre de cáncer") de la invención podrían incluirse entre las células altamente mutadas que distinguen de la "línea madre de cáncer" en la Patente de Estados Unidos 6.004.528. En segundo lugar, las mutaciones genéticas que dan lugar al cáncer son en gran medida intrínsecas a las células madre de tumor sólido en lugar de ser ambientales. El modelo de célula madre de tumor sólido predice que las células madre de tumor sólido pueden dar lugar a tumores adicionales después de su trasplante (explicando de este modo la metástasis) mientras que el modelo de "línea madre de cáncer" podría predecir que la "línea madre de cáncer" trasplantada podría no ser capaz de dar lugar a un nuevo tumor, porque lo que era tumorigénico era su ambiente anormal. De hecho, la capacidad para trasplantar células madre de tumor sólido humanas disociadas y fenotípicamente aisladas a ratones (en un ambiente que es muy diferente al ambiente normal del tumor), donde aún forman nuevos tumores, distingue a la presente invención frente al modelo de "línea madre de cáncer". En tercer lugar, las células madre de tumor sólido probablemente se dividan de una manera tanto simétrica como asimétrica, de tal forma que la división celular simétrica no es una propiedad obligatoria. En cuarto lugar, las células madre de

tumor sólido pueden dividirse rápida o lentamente, dependiendo de muchas variables, de tal forma que una velocidad de proliferación lenta no es una característica definitoria.

Tal como se ha descrito anteriormente, las células madre de tumor sólido pueden caracterizarse operativamente mediante marcadores de la superficie celular. Estos marcadores de la superficie celular pueden reconocerse mediante reactivos que se unen específicamente a los marcadores de la superficie celular. Por ejemplo, las proteínas, hidratos de carbono o lípidos sobre la superficie de las células madre de tumor sólido pueden reconocerse inmunológicamente mediante anticuerpos específicos para la proteína o hidrato de carbono particular (para la construcción y uso de anticuerpos para marcadores, véanse, Harlow, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999); véanse también los EJEMPLOS). El conjunto de marcadores presentes sobre las superficies celulares de las células madre de tumor sólido (las "células madre de cáncer" descritas en el presente documento) y ausentes de las superficies celulares de estas células es característico para las células madre de tumor sólido. Por lo tanto, las células madre de tumor sólido pueden seleccionarse mediante selección positiva y negativa de marcadores de la superficie celular. Un reactivo que se une a una célula madre de tumor sólido es un "marcador positivo" (es decir, un marcador presente sobre las superficies celulares de las células madre de tumor sólido) que puede usarse para la selección positiva de células madre de tumor sólido. Un reactivo que se une a un "marcador negativo" de célula madre de tumor sólido (es decir, un marcador no presente sobre las superficies de células madre de tumor sólido pero presente sobre las superficies de otras células obtenidas de tumores sólidos) puede usarse para la eliminación de aquellas células de tumor sólido en la población que no son células madre de tumor sólido (es decir, para la eliminación de células que no son células madre de tumor sólido).

En una realización, la discriminación entre células basada en la expresión de marcadores de superficie detectada se efectúa comparando la expresión detectada del marcador de la superficie celular en comparación con la expresión media por una población de células de control. Por ejemplo, la expresión de un marcador en una célula madre de tumor sólido puede compararse con la expresión media del marcador por las otras células procedentes del mismo tumor que la célula madre de tumor sólido. Otros métodos para discriminar entre células mediante expresión de marcadores incluyen métodos de clasificar células mediante citometría de flujo basándose en la expresión de marcadores (véase, Givan A, *Flow Cytometry: First Principles*, (Wiley-Liss, Nueva York, 1992); Owens MA y Loken MR., *Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice*, (Wiley-Liss, Nueva York, 1995)).

Los marcadores positivos de célula madre de tumor sólido también pueden estar presentes en células distintas de las células madre de tumor sólido. Los marcadores negativos de célula madre de tumor sólido también pueden estar ausentes en otras células distintas de las células madre de tumor sólido. Aunque es raro identificar un solo marcador que identifique a una célula madre, a menudo ha sido posible identificar combinaciones de marcadores positivos y negativos que identifican de manera unívoca a las células madre y permite su enriquecimiento sustancial en otros contextos. Morrison et al., *Cell* 96(5): 737-49 (1999); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(22): 10302-6 (1995); Morrison y Weissman, *Immunity* 1(8): 661-73 (1994).

Una "combinación de reactivos" es al menos dos reactivos que se unen a marcadores de la superficie celular tanto presentes (marcador positivo) o no presentes (marcador negativo) sobre las superficies de células madre de tumor sólido, o a una combinación de marcadores positivos y negativos (véanse los EJEMPLOS 7 y 8, TABLA 6). El uso de una combinación de anticuerpos específicos para marcadores de la superficie de células madre de tumor sólido en el método de la invención es útil para el aislamiento o enriquecimiento de células madre de tumor sólido de diversos tumores sólidos, incluyendo sarcomas, cánceres de ovario, y tumores mamarios. Puede encontrarse orientación en cuanto al uso de una combinación de reactivos en la solicitud de patente PTC WO 01/052143 (Morrison y Anderson).

Mediante la selección respecto de características fenotípicas entre las células obtenidas de un tumor sólido, pueden aislarse las células madre de tumor sólido de cualquier tumor sólido de un animal, particularmente cualquier tumor sólido de mamífero. Se apreciará que, teniendo en cuenta factores tales como afinidades de unión, se usan anticuerpos que reconocen variedades específicas de especie de marcadores para enriquecer en, y seleccionar células madre de tumor sólido. Los anticuerpos que reconocen las variedades específicas de especie de CD44, B38.1, CD24 y otros marcadores se usarán para enriquecer en o aislar células madre de tumor sólido de esa especie (por ejemplo, anticuerpo para un CD44 de ratón para células madre de tumor sólido de ratón, anticuerpo para un B38.1 de mono para células madre de tumor sólido de mono, etc.).

Un modelo eficaz de xenoinjerto de cáncer de mama humano. En el presente documento se describe un modelo de xenoinjerto para establecer tumores mediante la inyección de células de tumor sólido en un animal hospedador. El animal hospedador puede ser un organismo modelo, tal como un nematodo, una mosca de la fruta, pez cebra; preferentemente un mamífero de laboratorio, tal como un ratón (ratón desnudo, ratón SCID, ratón NOD/SCID, ratón Beige/SCID), rata, conejo, o primate. Se seleccionaron los ratones NOD-SCID gravemente inmunodeficientes como receptores para maximizar la participación de células inyectadas. Los ratones inmunodeficientes no rechazan los tejidos humanos, y los ratones SCID y NOD-SCID se han usado como hospedadores para estudios *in vivo* de la hematopoyesis humana y el injerto de tejidos. McCune et al., *Science* 241: 1632-9 (1988); Kamel-Reid y Dick, *Science* 242: 1706-9 (1988); Larochelle et al., *Nat. Med.* 2: 1329-37 (1996). Además, También se han usado ratones Beige/SCID.

Se han establecido xenoinjertos de tumores de especímenes de mastectomía de todos los pacientes que se han ensayado hasta la fecha (véase el EJEMPLO 7). Los tumores en ratones también se han establecido a partir de efusiones pleurales malignas. Además, se han establecido tumores mediante inyección subcutánea de células que se habían obtenido de dos sarcomas. Además, para todos los tumores que se probaron, se fue capaz de producir suspensiones de células individuales (o suspensiones con pocos agregados de células, tal como menos de 100; preferentemente menos de 10) y después transferir los tumores. Este ensayo de xenoinjerto es útil para ensayos biológicos y moleculares para caracterizar a las células madre de tumor sólido tumorigénicas clonogénicas.

Los ratones NOD/SCID o Beige/SCID pueden inmunosuprimirse adicionalmente, usando VP-16 (véanse los EJEMPLOS 1 y 3), radioterapia, quimioterapia, u otros agentes biológicos inmunosupresores.

Este ensayo *in vivo* es particularmente ventajoso para entender mejor el cáncer de mama y desarrollar nuevos tratamientos para esta enfermedad. Hasta ahora, ha sido imposible efectuar estudios biológicos y moleculares que impliquen cáncer de mama primario. Dichos estudios se habían limitado a líneas celulares. Desafortunadamente, se sabe bien que la mayoría de las propiedades fundamentales de las células de cáncer de mama cambian en cultivo tisular. Fenhall et al., British J. Cancer 81: 1142-1149 (1999). Este último problema solo empeora con el cultivo continuado de las células.

Por el contrario, usando el método de la invención, las células de cáncer de mama (preferentemente enriquecidas respecto de células de cáncer de mama) se inyectan en ratones inmunocomprometidos, para hacer crecer el tumor. En una realización, las células se inyectan bien en los panículos adiposos mamarios de ratones o por vía subcutánea en los ratones. Además, los tumores pueden establecerse a partir de suspensiones de células individuales (o suspensiones con pocos agregados de célula, tal como menos de 100; preferentemente menos de 10) y después transferirse los tumores a otros ratones.

El enriquecimiento de células madre de tumor sólido y el aislamiento de células madre de tumor sólido distinguen a la presente invención del "bioensayo primario de células madre tumorales" citado en la Patente de Estados Unidos n.º 4.411.990 (véase también Hamburger et al., Blood 47: 995 (1976); Salmon et al., AACR Abstracts 19: 231, Resumen n.º 922 (1978)). En ensayos de cultivo tisular anteriores, solo una proporción de las células tumorales fueron capaces de formar colonias en un ensayo clonogénico *in vitro*, y normalmente se necesitó trasplantar grandes números de células (tales como células de mieloma y hematopoyéticas) para formar tumores *in vivo*. Ogawa M et al., Cancer Research 31(12): 2116-2119 (1971); Ogawa M et al., Cancer Research 33(12): 3172-3175, 1973. Salmon SE y Hamburger AW, Science 197: 461-463 (1977). Schlag P y Flentje D, Cancer Treatment Reviews 11 Suppl A:131-7 (1984). Esto dio lugar a la hipótesis de que solo un pequeño número de células tumorales son realmente tumorigénicas. Sin embargo, debido a las limitaciones técnicas, esta fracción tumorigénica de células no pudo aislarse de las células no tumorigénicas y por lo tanto no pudo demostrarse que fuesen subconjuntos intrínsecamente diferentes de células tumorales, algunas con un potencial proliferativo sustancial y otras con un potencial limitado. Es decir, a menos que las células tumorigénicas puedan purificarse y distinguirse de las células no tumorigénicas sigue siendo posible que todas las células tumorales tengan una baja probabilidad similar de mostrar actividad clonogénica en un ensayo. Además, sin la capacidad para identificar y aislar la fracción de células tumorigénicas (las células madre de tumor), la Patente de Estados Unidos n.º 4.411.990 carece de las utilidades descritas en la presente invención. Por ejemplo, sin marcadores para aislar las células tumorigénicas no es posible estudiar sus patrones de expresión genética, o su expresión de marcadores diagnósticos, o su respuesta a agentes terapéuticos. Varios problemas técnicos impidieron que invenciones anteriores aislasen células tumorigénicas o células madre de tumor. En primer lugar, los ensayos *in vitro* dieron como resultado cierta formación inicial de colonias, pero normalmente las células dejaron de proliferar y no pudieron crecerse en cultivo de manera continua. Salmon, S.E. y Hamburger AW, Science 197: 461-463 (1977); Schlag P et al., Cancer Treatment Reviews. 11 Supl A:131-7, (1984); Salmon SE, Recent Results in Cancer Research 94: 8 (1984). Asimismo, las células de muchos tumores no pudieron de modo alguno formar colonias *in vitro*. Carney DN et al, Stem Cells 1: 149-164 (1981). De manera similar, las células disociadas aisladas de la mayoría de tumores sólidos rara vez formaron tumores en modelos de ratón inmunodeficientes. Sakakibara T et al., Cancer J. Si. Am 2: 291-300 (1996); Mueller B y Reisfeld RA, Cancer Metastasis Rev. 10: 193-200, (1991). La observación de que solo clones concretos de las líneas celulares de cáncer de cultivo tisular fueron capaces de formar tumores en los modelos *in vivo* ilustra adicionalmente este problema (Hamilton TC et al., Cancer Research 44(11): 5286-90 (1984)). Por lo tanto, las limitaciones en los ensayos hicieron imposible determinar si las colonias surgieron a partir de células madre que habían perdido su capacidad para proliferar *in vitro*, a partir de células no tumorigénicas que tenían un potencial proliferativo limitado, o si el pequeño número de células capaz de formar colonias *in vitro* se debía a una población de "células madre" dentro del tumor o se debía a una célula rara que podía proliferar *in vitro*. Además, no era posible distinguir poblaciones fenotípicamente diferentes de células: antes de la presente invención, se efectuó un uso muy limitado de técnicas, tales como la citometría de flujo, para separar y analizar poblaciones fenotípicamente distintas de células de tumor sólido mediante citometría de flujo. De hecho, los ensayos clonogénicos usados en la técnica anterior no predecían el comportamiento del tumor de un paciente y cayeron en desuso. Von Hoff DD et al., Cancer. 67(1): 20-7 (1991); Federico M et al., Gynecologic Oncology. 55(3 Pt 2): S156-63 (1994). Por lo tanto, las limitaciones en las técnicas de separación celular, y los ensayos usados en la técnica anterior hicieron imposible la purificación de células tumorigénicas. Por lo tanto, fue imposible demostrar la existencia de hipotéticas células madre

de tumor.

Papel de Notch en el cáncer de mama. La familia de receptores Notch se ha involucrado en el desarrollo y diferenciación de células madre (véase Morrison et al., Cell 101(5): 499-510 (2000); Artavanis-Tsakonas et al., Science 284: 770 (1999); y Artavanis-Tsakonas et al., Science 268: 225-232 (1995); Patentes de Estados Unidos n.º 6.090.922). Notch se identificó originalmente en *Drosophila* mediante mutaciones de pérdida de función que produjeron demasiadas neuronas a expensas de otros tipos celulares. Poulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 23: 133 (1937). En todos los modelos animales ensayados, las mutaciones en el receptor Notch dan como resultado anomalías en el desarrollo. En *C. elegans*, Notch es necesario para la auto-renovación de las células madre de línea germinal. Berry et al., Development 124(4): 925-36 (1997). En ratas, Notch regula la diferenciación de las células madre de la cresta neural. Morrison et al., Cell 101(5): 499-510 (2000). La activación transitoria de Notch inicia un interruptor irreversible desde la neurogénesis hacia la gliogénesis por células madre de la cresta neural.

Debido a que las células vecinas pueden expresar receptores y ligandos de Notch, una célula puede afectar al destino de una célula vecina activando la señalización de Notch en la célula vecina.

Proteínas de nombres complicados, tales como Jagged (Shimizu et al., Journal of Biological Chemistry 274(46): 32961-9 (1999); Jarriault et al., Molecular and Cellular Biology 18: 7423-7431 (1998)), Serrate, y Delta (y variantes de cada una, tales como Delta1, Delta2, Delta3, Delta4, y Jagged2, LAG-2 y APX-1 en *C. elegans*), se unen al receptor de Notch y activan una ruta de señalización aguas abajo que evita que las células vecinas se conviertan en progenitores neurales. Un ligando recientemente identificado es D114, un ligando de Notch de la familia Delta expresado en el endotelio arterial. Shutter et al., Genes Dev 14(11): 1313-8 (2000)).

Los ligandos de Notch pueden unirse y activar a receptores de la familia de Notch de manera promiscua. La expresión de otros genes, como los miembros de la familia de Fringe (Panin et al., Nature 387(6636): 908-912 (1997)), pueden modificar las interacciones de receptores de Notch con ligandos de Notch. Los miembros de la familia de Numb también pueden modificar la señalización de Notch a nivel intracelular.

La unión de ligandos a Notch da como resultado la activación de una proteína similar a gamma-secretasa dependiente de presenilina 1 que escinde a Notch. De Strooper et al., Nature 398:518-522 (1999), Mumm et al., Molecular Cell. 5:197-206 (2000). La escisión en la región intracelular puede implicar una convertasa similar a furina. Logeat et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 8108-8112 (1998). El dominio intracelular se libera y transactiva genes asociándose con la proteína de unión a ADN RBP-J. Kato et al., Development 124: 4133-4141 (1997)). Se cree que Notch 1, Notch 2 y Notch 4 transactivan genes, tales como miembros de la familia de Enhancer of Split (HES, Potenciador de la Separación), mientras que la señalización de Notch 3 puede ser inhibidora. Beatus et al., Development 126: 3925-3935 (1999). Finalmente, las proteínas secretadas de la familia de Fringe se unen a los receptores de Notch y modifican su función. Zhang y Gridley, Nature 394(1998).

En mamíferos, se conocen cuatro miembros de la familia de Notch. Notch 4 es el ortólogo humano del oncogén int-3 de ratón que desempeña un papel en el cáncer de mama en ratones. Gallahan et al., Cancer Res. 56(8): 1775-85 (1996); Uyttendaele et al., Development 2122: 251 (1996); Imatani y Callahan, Oncogene 19(2): 223-31 (2000)).

En el presente documento se divulga el descubrimiento de que Notch 4 desempeña un papel tanto el desarrollo mamario normal y en la tumorigénesis. Dentro de un tumor individual, solo una pequeña subpoblación de células tumorigénicas expresa altos niveles de Notch 4. Un anticuerpo que reconozca a Notch 4 bloquearía el crecimiento de las células tumorales de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* (véanse los EJEMPLOS 2, 5, 12 y 15). En una realización, el anticuerpo se une al dominio extracelular de Notch 4. En una realización particular, el anticuerpo se une a la región polipeptídica `LLCVSVVRPRGLLCGSFPE` (LeuLeuCysValSerValValArgProArgGlyLeu-LeuCysGlySerPheProGlu) (SEC ID N°:1). Sin embargo, puede usarse cualquier anticuerpo anti-Notch 4 que inhiba la activación de Notch para impedir la supervivencia tumoral.

Los inhibidores de la señalización de Notch (tales como Numb y Numb-like; o anticuerpos o moléculas pequeñas que bloqueen la activación de Notch) pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento para inhibir a las células madre de tumor sólido. De este modo, se modifica la ruta de Notch para eliminar o inhibir la proliferación de células madre de tumor sólido.

Por el contrario, anteriormente se descubrió que la estimulación de Notch usando Delta soluble (Han et al., Blood 95(5): 161625 (2000)), un ligando de Notch, promovía el crecimiento y supervivencia de células tumorales *in vitro*. Por lo tanto, se descubrió anteriormente que la estimulación de la ruta de Notch promueve el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas.

La invención difiere de la manipulación de células diferenciadas de manera no terminal usando la ruta de Notch proporcionada en la Patente de Estados Unidos n.º 5.780.300. La Patente de Estados Unidos n.º 5.780.300 aborda la modificación de células normales, no de células cancerosas. Esa patente se refiere a métodos para la expansión de células diferenciadas de manera no terminal (células precursoras normales) usando agonistas de la función de

Notch, inhibiendo la diferenciación de las células sin inhibir la proliferación (activación mitótica) de tal forma que se obtiene una población expandida de células diferenciadas de manera no terminal. Estas células expandidas pueden usarse en terapia de reemplazo celular, un uso que es incompatible con el objetivo de eliminar o inhibir la proliferación de células madre de tumor sólido modificando la señalización de Notch en la presente divulgación.

Aspectos terapéuticos de la invención. Una consecuencia del modelo de célula madre de tumor sólido de la invención es que, para tratar el cáncer de manera eficaz y lograr tasas de curación mayores, las terapias anticáncer deben dirigirse contra las células madre de tumor sólido. Ya que las terapias actuales se dirigen contra toda la población, pueden ser ineficaces en cuanto a la erradicación de las células madre de tumor sólido. Las limitaciones de las terapias actuales para el cáncer proceden de la incapacidad para eliminar de manera eficaz células madre de tumor sólido. La identificación de células madre de tumor sólido permite el direccionamiento específico de agentes terapéuticos a esta población de células, dando como resultado tratamientos contra el cáncer más eficaces. Este concepto podría cambiar de manera fundamental nuestra estrategia para el tratamiento del cáncer.

Los avances en la biotecnología moderna han facilitado la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer. Los avances en la genómica han hecho posible secuenciar e identificar los 10.000 a 30.000 genes que se expresan en tipos celulares individuales. Se ha secuenciado el genoma humano. Esto ha dado como resultado la identificación de nuevas proteínas implicadas en cientos de procesos biológicos, tales como la proliferación, la muerte celular y la inmortalización, proporcionando dianas para la intervención farmacológica. Aunque la genómica proporciona un medio poderoso para identificar dianas farmacológicas en células de cáncer, estas dianas son válidas únicamente si están presentes las dianas dentro de la población celular tumorigénica. Para que sea eficaz, la genómica debe enfocarse en poblaciones individuales dentro de las células heterogéneas que componen un tumor que sean responsables del crecimiento tumorigénico. En los tumores sólidos, estas son las células madre de tumor sólido. Adicionalmente, aún no se ha usado la genómica para identificar genes expresados en poblaciones de células purificadas procedentes de tejidos cancerosos.

Uno de los principales problemas para identificar nuevos agentes terapéuticos para el cáncer es la determinación de cuáles de los cientos de genes identificados en los proyectos de secuenciación a gran escala son las dianas farmacológicas más importantes desde el punto de vista clínico. Esto se hace especialmente difícil ya que los tumores sólidos consisten en una mezcla de muchos tipos de células normales y una población heterogénea de células tumorales. Un modo de reducir la complejidad es producir ADNc tras la microdissección de tumores sólidos para enriquecer respecto de células tumorales (véase más adelante). Esta técnica se basa en la suposición de que el patólogo que disecciona las células tumorales puede predecir qué células son tumorigénicas basándose en su apariencia. Sin embargo, las células pueden ser similares desde el punto de vista morfológico y seguir siendo funcionalmente heterogéneas. Además, las células obtenidas mediante microdissección no son viables y por lo tanto las propiedades funcionales de dichas células no pueden probarse o verificarse.

En su lugar, mediante los métodos de la invención, se puede usar citometría de flujo (tal como FACS) y el modelo de xenoinjerto animal descrito en el presente documento para enriquecer respecto de poblaciones celulares específicas. Esta técnica tiene la ventaja de ser capaz de aislar de manera simultánea poblaciones fenotípicamente puras de células viables normales y tumorales para análisis molecular. Por lo tanto, la citometría de flujo permite analizar las funciones de las poblaciones celulares y usarlas en ensayos biológicos además de estudiar sus perfiles de expresión génica. Además, dichas células pueden caracterizarse también en ensayos biológicos. Por ejemplo, las células mesenquimales (estromales) pueden analizarse respecto de la producción de factores de crecimiento, proteínas de matriz y proteasas, las células endoteliales pueden analizarse respecto de la producción de factores específicos implicados en el apoyo al crecimiento de los tumores sólidos (tal como la neovascularización), y pueden aislarse y analizarse diferentes conjuntos de células tumorales de un tumor sólido respecto de su tumorigenicidad, resistencia a fármacos y potencial metastásico.

"Enriquecida", como en una población de células enriquecida, puede definirse basándose en el número aumentado de células que tienen un marcador concreto en un conjunto fraccionado de células en comparación con el número de células que tienen el marcador en el conjunto de células no fraccionado. Sin embargo, el término "enriquecido" puede definirse preferentemente mediante la función tumorigénica como el número mínimo de células que forman tumores a una frecuencia de dilución limitante en ratones de ensayo. Por lo tanto, si 500 células madre tumorales forman tumores en el 63 % de los animales de ensayo, pero se necesitan 5000 células tumorales no fraccionadas para formar tumores en el 63 % de los animales de ensayo, la población de células madre de tumor sólido está enriquecida 10 veces respecto de actividad tumorigénica (véanse los EJEMPLOS). El modelo de célula madre de tumor sólido (FIG. 1A) proporciona la unión entre estas dos definiciones de enriquecimiento (fenotípico y funcional).

Los métodos FACS que solo usan CD44 pueden enriquecer a las células madre de tumor sólido en al menos 2 veces (véanse los EJEMPLOS 1 y 3). Los métodos FACS que usan B38.1 y CD24 pueden enriquecer respecto de células madre de tumor sólido en 5-6 veces (véase el EJEMPLO 3). El enriquecimiento usando marcadores adicionales puede enriquecer en 10 veces o más y puede usarse para aislar células madre de tumor sólido.

"Aislado" se refiere a una célula que se retira de su ambiente natural (tal como en un tumor sólido) y que está aislada o separada, y está libre en aproximadamente un 75 %, y más preferentemente libre en aproximadamente un 90 %, de otras células con las que está presente de manera natural, pero que carecen del marcador en el que se basó el aislamiento de las células.

La purificación (enriquecimiento o aislamiento) de subconjuntos de células cancerosas de un tumor sólido permite a un experto en la técnica de la oncología distinguir entre modelos clásicos de cáncer y el modelo de célula madre de tumor sólido (FIG. 1). Si, de hecho, una minoría de células de tumor sólido tiene propiedades de célula madre, para identificar de manera eficaz los genes necesarios para la proliferación tumoral y la resistencia a fármacos, la genómica debe centrarse en la población de células madre. Si, sin embargo, la genómica se dirige al grueso de la población en lugar de a la de células madre de tumor sólido, por lo que las dianas farmacológicas más prometedoras se ven oscurecidas o se pierden en el marasmo de los demás genes expresados por las otras células dentro de un tumor que no tienen la capacidad para proliferar de manera extensiva.

En algunos de los EJEMPLOS, se puso el foco de atención en las células tumorigénicas de cáncer de mama. Centrarse en las poblaciones de células individuales dentro de un tumor sólido proporciona un entendimiento más claro de cómo enfocar nuevos tratamientos para el cáncer e identificar nuevas dianas para el descubrimiento de fármacos. Además, la purificación de células madre de tumor sólido (tales como tumorigénicas de cáncer de mama) proporciona un material para la exploración respecto de la sensibilidad a fármacos e identificar marcadores que predigan la tumorigenicidad o el potencial metastásico.

Proliferación in vivo de células madre de tumor sólido. La proliferación *in vivo* de células madre de tumor sólido puede lograrse mediante la inyección de células madre de tumor sólido en animales, preferentemente mamíferos, más preferentemente en roedores, tales como ratones (debido a los métodos predecibles que se han desarrollado en la técnica para la inyección en roedores de laboratorio), y lo más preferentemente en ratones inmunocomprometidos, tales como ratones SCID, ratones Beige/SCID o ratones NOD/SCID (véanse los EJEMPLOS). Se inyecta a ratones NOD/SCID el número diverso de células y se observan respecto de la formación de tumores. La inyección puede ser mediante cualquier método conocido en la técnica, después del enriquecimiento de la población de células inyectada en células madre de tumor sólido.

En una realización particular, para establecer tumores de cáncer de mama humanos en el modelo de ratón NOD/SCID, se anestesió a ratones NOD/SCID hembra de ocho semanas mediante una inyección intraperitoneal de 0,2 ml de ketamina/xilazina (300 mg de ketamina combinados con 20 mg de xilazina en un volumen de 4 ml). Después, se usaron 0,02 ml de la solución diluida en HBSS por cada 20 g de ratón. Entonces se trató a los ratones con VP-16 (etopósido) mediante una inyección intraperitoneal (30 mg de etopósido por cada 1 kg, diluido en HBSS sin suero para un volumen final de inyección de 0,2 ml). Al mismo tiempo, se colocaron gránulos de estrógenos por vía subcutánea en la parte anterior de los cuellos de los ratones usando un trocar. Entonces se templó a los ratones y se colocaron de vuelta en sus jaulas después de que despertasen. Todas las inyecciones/implantes de tumores se efectuaron a los 3-5 días después de este procedimiento.

Para la implantación de especímenes frescos, las muestras de tumores de mama humano se recibieron dentro de la hora posterior a la cirugía. Estos tumores se cortaron con tijeras en pequeños trozos, y se trituraron los trozos con una cuchilla para obtener trozos de 2 x 2 mm. La trituración se efectuó en medio RPMI 1640 estéril suplementado con suero fetal bovino al 20 % en condiciones estériles sobre hielo. Los trozos de tumor se lavaron entonces con HBSS sin suero justo antes de implantarlos. Se efectuó una incisión de 2 mm en el área intermedia del abdomen, y usando un trocar, se implantaron uno o dos trozos pequeños de tumor en los panículos adiposos mamarios superior derecho y superior izquierdo (justo por debajo del segundo pezón en ambos lados). Se enrolló dos veces una sutura 6-0 alrededor del PAM-pezón permitiendo que mantuviese a los trozos implantados en su sitio. Las suturas se retiraron 5 días después. Se usó Nexaban para sellar la incisión y se controló semanalmente a los ratones para crecimiento tumoral.

Para la inyección de las efusiones pleurales o de las células de tumor sólido disociadas, se recibieron las células poco después de la cirugía y se lavaron con HBSS sin suero. Entonces se suspendieron las células en mezcla de RPMI sin suero/Matrigel (volumen 1:1) y después se inyectaron en los panículos mamarios superiores izquierdo y derecho usando una aguja del calibre 18. Para hacer esto, se suspendió el número deseado de células en 0,2 ml y se inyectaron. El sitio de la inyección con aguja se selló con Nexaban para evitar cualquier filtración de células.

Para la inyección de células tumorales digeridas, se cortaron en pequeños trozos tumores de un paciente (tumores sólidos) o crecidos en ratones (mediante los métodos descritos en el presente documento) y después se trituraron completamente usando cuchillas estériles. Los trozos resultantes se mezclaron entonces con solución de Ultra-pure Collagenase III en HBSS (200-250 U de colagenasa/ml) y se dejaron incubar a 37 °C durante 3-4 h, pipeteando con una pipeta de 10 ml cada 15-20 minutos. Al final de la incubación, las células se filtraron a través de una malla de 45 micrometros y se lavaron con RPMI-FBS al 20 %, después se lavaron dos veces con HBSS. Las células que iban a inyectarse se suspendieron entonces en mezcla de HBSS/Matrigel (volumen 1:1) y se inyectaron en el panículo adiposo mamario o por vía subcutánea, tal como se describe anteriormente. Puede usarse Nexaban para sellar el sitio de inyección.

Para el análisis del tumor xenotrasplantado, se retira un tumor sólido del ratón y se convierte en una suspensión de células individuales. Las células se tiñen y se analizan mediante citometría de flujo (FACS) usando métodos conocidos para los expertos en la materia (Morrison y Weissman, *Immunity* 1(8): 661-73 (1994)). El fenotipo de las células tumorigénicas es CD44⁺CD24^{-lo} en todos los tumores, y B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo} en la mayoría de tumores.

5 Entonces se efectuaron análisis de dilución limitante de células aisladas mediante FACS basándose en la expresión de estos marcadores. A continuación, se purificaron adicionalmente las células madre de cáncer de mama. Las células se tiñen con 7AAD (que tiñe a las células muertas), anti-H2K-PE (que tiñe a las células de ratón), y combinaciones de anticuerpos contra diversos marcadores que tienen patrones de expresión heterogéneos por las células cancerosas incluyendo anti-B38.1, -anexina V, -Notch 4, -CD9, -CD24, -MUC1, -CD49F, -CD62P, -P-

10 glicoproteína, -Notch 1, -520C9, -260F9 y -317G5. Se usa FACS para aislar células humanas viables que expresan o no expresan uno de los antígenos que se expresan de manera diferencial. Una combinación de marcadores permite el mayor enriquecimiento de células tumorigénicas. Para los ensayos de dilución limitante, se analizan cien, mil, diez mil y cien mil células de cada población *in vivo*.

15 Se inyectó a los ratones SCID, NOD/SCID o Beige/SCID con el diverso número de células y se observan respecto de tumores. Cualquier tumor formado se extrae para examen patológico y análisis FACS. Las pruebas se repiten (por ejemplo, aproximadamente diez veces) para confirmar los resultados. De este modo se determinan los fenotipos de las células tumorigénicas.

20 Pueden encontrarse otras técnicas generales para la formulación e inyección de células en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20^a edición (Mack Publishing Co., Easton, PA). Las rutas adecuadas pueden incluir administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas (véase lo anterior), intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares, solo por nombrar solo algunas. Para inyección, los agentes descritos en el presente documento

25 pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para dicha administración transmucosal, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

30 Mediante el uso de poblaciones de células enriquecidas en células madre de tumor sólido, la invención es una mejora frente a los métodos de Mueller y Reisfeld, *Cancer Metastasis Rev.* 10: 193-200 (1991) (que usaron el ratón SCID, que permite el crecimiento diseminado para una serie de tumores humanos, en particular, trastornos hematológicos y melanoma maligno) y de Sakakibara et al., *Cancer J. Sci. Am.* 2: 291-300 (1996) (que estudiaron el crecimiento y el potencial metastásico de especímenes de cirugía de carcinomas de mama injertados en el pániculo

35 adiposo abdominal (gonadal) grande de ratones con inmunodeficiencia grave combinada (SCID)). Sakakibara et al. observaron que situar tumores mamarios humanos dentro del pániculo adiposo gonadal podía dar como resultado que los tumores crecieran bien rápido, lentamente, o en absoluto. De los 48 tumores estudiados, 12 (25 %), incluyendo uno de los tres tumores procedentes de nódulo linfático, crecieron lo suficientemente rápido en algunos o todos los ratones implantados (es decir, los tumores alcanzaron un diámetro de 2-3 cm a los 2-6 meses) para

40 permitir su pase repetido.

Por el contrario, la inyección de células madre de tumor sólido puede dar como resultado de manera consistente el establecimiento satisfactorio de tumores en más del 75 % de ocasiones, preferentemente en más del 80 % de ocasiones, más preferentemente más del 85 %, más del 90 %, o más del 95 % de ocasiones. Los presentes

45 inventores han logrado un establecimiento 100 % satisfactorio de tumores a partir de los cinco tumores ensayados, así como de las tres efusiones pleurales (véanse los EJEMPLOS). Además, la invención proporciona el establecimiento ventajoso de tumores sólidos (particularmente tumores de células madre de tumores mamarios) en los pániculos adiposos mamarios, un área no accesible para el establecimiento usando los métodos de Sakakibara et al., *Cancer J.* 2: 291-300 (1996).

50 *Proliferación in vitro de células madre de tumor sólido.* Las células pueden obtenerse de tejido de tumor sólido mediante disociación de células individuales. El tejido de un tumor particular se retira usando un procedimiento estéril, y las células se disocian usando cualquier método conocido en la técnica (véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., (Wiley Interscience, Nueva York, 1993), y *Molecular Biology LabFax*, Brown, ed. (Academic Press, 1991)), incluyendo tratamiento con enzimas, tales como tripsina, colagenasa y similares, o usando métodos físicos de disociación, tales como un instrumento romo. Los métodos de disociación se optimizan ensayando diferentes concentraciones de enzimas y durante diferentes periodos de tiempo, para

55 maximizar la viabilidad celular, la retención de marcadores de la superficie celular, y la capacidad para sobrevivir en cultivo (Worthington Enzyme Manual, Von Worthington, ed. (Worthington Biochemical Corporation, 2000)). Las células disociadas se centrifugan a baja velocidad, entre 200 y 2000 rpm, normalmente a aproximadamente 1000 (210 g), y después se resuspenden en medio de cultivo. Para una orientación acerca de los métodos de cultivo celular, véase Spector et al., *Cells: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1998).

65

Las células tumorales disociadas pueden ponerse en cualquier medio de cultivo conocido capaz de soportar el crecimiento celular, incluyendo HEM, DMEM, RPMI, F-12, y similares, que contienen suplementos que son necesarios para el metabolismo celular, tales como glutamina y otros aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas útiles, tales como transferrina y similares. El medio también puede contener antibióticos para evitar contaminación con levaduras, bacterias y hongos, tales como penicilina, estreptomycin, gentamicina y similares. En algunos casos, el medio puede contener suero derivado de bovino, equino, pollo y similares. Sin embargo, una realización preferida para la proliferación de células madre de tumor sólido es usar un medio de cultivo definido, bajo en suero. Un medio de cultivo preferido para células madre de tumor sólido es un medio de cultivo definido que comprende una mezcla de F12 de Ham, suero de ternero fetal al 2 %, y una mezcla definida de hormona y sal, ya sea insulina, transferrina, y selenio o suplemento B27, Brewer et al., J. Neuroscience Res. 35: 567 (1993).

El medio de cultivo puede ser un medio químicamente definido que está suplementado con suero fetal bovino o extracto embrionario de pollo (CEE) como fuente de mitógenos y factores de supervivencia para permitir el crecimiento de células madre tumorales en cultivo. Pueden usarse otros medios de cultivo sin suero que contienen uno o más factores de crecimiento predeterminados eficaces para inducir la proliferación de células madre, tales como suplemento N2 o suplemento B27, conocidos para los expertos en la materia para aislar y propagar células madre de tumor sólido de otras especies aviares y de mamífero, tales como humanas. Véanse las Patentes de Estados Unidos n.º 5.750.376, 5.851.832, y 5.753.506; Atlas et al., Handbook of Microbiological Media (CRC Press, Boca, Raton, Louisiana, 1993); Freshney, Cutler on Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 3ª Edición (Wiley-Liss, Nueva York, 1994).

El medio de cultivo para la proliferación de células madre de tumor sólido soporta, por lo tanto, el crecimiento de células madre de tumor sólido y de la descendencia proliferada. La "descendencia proliferada" son células tumorales no diferenciadas, incluyendo células madre de tumor sólido, ya que las células madre de tumor sólido tienen una capacidad para proliferar de manera extensiva en cultivo.

Las condiciones para el cultivo deben ser semejantes a las condiciones fisiológicas. El pH del medio de cultivo debe ser próximo al pH fisiológico, preferentemente entre pH 6-8, más preferentemente entre aproximadamente pH 7 a 7,8, prefiriéndose especialmente pH 7,4. Las temperaturas fisiológicas oscilan entre aproximadamente 30 °C a 40 °C. Las células se cultivan preferentemente a temperaturas entre aproximadamente 32 °C a aproximadamente 38 °C, y más preferentemente entre aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C. De manera similar, las células pueden cultivarse con niveles de O₂ que están reducidos de manera comparable en relación a las concentraciones de O₂ en el aire, de tal forma que la concentración de O₂ es comparable a los niveles fisiológicos (1-6 %), en lugar de O₂ al 20 % en el aire.

Las células madre de tumor sólido de un paciente particular, una vez que se han proliferado *in vitro*, pueden analizarse y explorarse. Las células madre de tumor sólido proliferadas *in vitro* también pueden modificarse genéticamente usando técnicas conocidas en la materia (véase más adelante; véase también, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., (Wiley Interscience, Nueva York, 1993)). La modificación genética *in vitro* puede ser más deseable en determinadas circunstancias que las técnicas de modificación genética *in vivo* cuando se requiere un control mayor frente a la infección con el material genético.

Las células madre de tumor sólido y la descendencia de las células madre puede criopreservarse hasta que se necesiten mediante cualquier método conocido en la técnica. Las células pueden suspenderse en una solución isotónica, preferentemente un medio de cultivo celular, que contiene un crioprotector concreto. Dichos crioprotectores incluyen dimetil sulfoxido (DMSO), glicerol y similares. Estos crioprotectores se usan a una concentración del 5-15 %, preferentemente del 8-10 %. Las células se congelan gradualmente a una temperatura de -10 °C a -150 °C, preferentemente de -20 °C a -100 °C, y más preferentemente -150 °C.

Se proporciona orientación adicional para el cultivo *in vitro* de células madre de tumor sólido en el EJEMPLO 9 y en la FIG. 9.

Modificación genética de células madre de tumor sólido y de la descendencia de las células madre de tumor sólido. En el estado no diferenciado, las células madre de tumor sólido se dividen rápidamente y por lo tanto son dianas excelentes para modificación genética. La expresión "modificación genética", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la alteración estable o transitoria del genotipo de una célula precursora mediante la introducción intencionada de ADN exógeno. El ADN puede ser sintético o de origen natural, y puede contener genes, porciones de genes, u otras secuencias de ADN útiles. La expresión "modificación genética", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir alteraciones de origen natural, tales como aquellas que suceden mediante la actividad viral natural, la recombinación genética natural, o similares. Los métodos generales para la modificación genética de células eucariotas se conocen en la técnica. Véase, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., (Wiley Interscience, Nueva York, 1993)).

Hay disponibles muchos métodos para introducir vectores en células o tejidos y son igualmente adecuados para su uso con células madre de tumor sólido *in vivo*, *In vitro*, y *ex vivo*. Los vectores pueden introducirse en células madre hematopoyéticas extraídas del paciente y propagadas clonalmente. Mediante el método de la invención, dichos métodos se extienden a células madre de tumor sólido.

"Transformación" o "modificación genética", tal como se definen en el presente documento, describe un proceso mediante el cual ADN exógeno entra y cambia a una célula receptora. La transformación puede suceder en condiciones naturales o artificiales de acuerdo con diversos métodos bien conocidos en la técnica, y puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota. El método para la transformación se selecciona basándose en el tipo de célula hospedadora que se esté transformando e incluye, pero sin limitación, infección viral, electroporación, choque térmico, lipofección, y bombardeo con micropartículas. La expresión células "transformadas" incluye células transformadas de manera estable en las que el ADN insertado es capaz de replicarse bien como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma hospedador, así como células transformadas de manera transitoria que expresan el ADN o ARN insertado durante periodos de tiempo limitados.

La manipulación genética de las células de tumor primario se ha descrito previamente por Patel et al., Human Gene Therapy 5: 577-584 (1994). La modificación genética de una célula puede lograrse usando una o más técnicas bien conocidas en el campo de la terapia génica. Mulligan RC, Human Gene Therapy 5: 543-563 (1993). Los métodos de transducción viral pueden comprender el uso de un virus de ADN recombinante o de ARN que comprenda una secuencia de ácido nucleico que dirija o inhiba la expresión de una proteína para infectar a una célula diana. Un virus de ADN adecuado para su uso en la presente invención comprende, pero sin limitación, un adenovirus (Ad), un virus adeno-asociado (AAV), un herpes virus, un virus vaccinia o un virus de la polio. Un virus de ARN adecuado para su uso en la presente invención incluye, pero sin limitación, un retrovirus o un virus Sindbis. Existen varios de dichos virus de ADN y ARN que son adecuados para su uso en la presente invención.

Se ha demostrado que los vectores adenovirales son especialmente útiles para transferir genes en células eucariotas para el desarrollo de vacunas (Graham FL y Prevec L, en Vaccines: New Approaches to Immunological Problems, Ellis RV ed., 363-390 (Butterworth- Heinemann, Boston, 1992).

Se proporciona orientación específica para la modificación genética de células madre de tumor sólido en el EJEMPLO 13 y en las FIG. 15-18.

Las técnicas de administración "no virales" que se han usado o propuesto para la terapia génica incluyen complejos de ADN-ligando, complejos de adenovirus-ligando-ADN, inyección directa de ADN, precipitación de CaPO_4 , técnicas de pistola génica, electroporación, y lipofección. Mulligan RC, Science 260: 926-932 (1993). Cualquiera de estos métodos está ampliamente disponible para un experto en la materia y serán adecuados para su uso en la presente invención. Hay disponibles otros métodos adecuados para un experto en la materia, y debe entenderse que la presente invención puede lograrse usando cualquiera de los métodos de transfección disponibles. La lipofección puede lograrse encapsulando la molécula de ADN aislada dentro de una partícula liposómica y poniendo en contacto la partícula liposómica con la membrana celular de la célula diana. Los liposomas son partículas coloidales autoensamblantes en las que una bicapa lipídica, compuesta de moléculas anfifílicas, tales como fosfatidil serina o fosfatidil colina, encapsula una porción del medio circundante, de tal forma que la bicapa lipídica rodea a un interior hidrófilo. Pueden construirse liposomas unilamelares o multilamelares de tal forma que el interior contenga un agente químico, fármaco, o, como en la presente invención, una molécula de ADN aislada. La administración mediante transfección, mediante inyecciones de liposomas, o mediante polímeros policatiónicos puede lograrse usando métodos que se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Goldman, C. K. et al. Nature Biotechnology 15:462-466 (1997)).

Dos tipos de célula madre de tumor sólido de interés particular son mutantes de eliminación y mutantes de sobreexpresión. Los mutantes de eliminación son células de tipo silvestre que se han modificado genéticamente de tal forma que un solo gen, normalmente un gen codificante de una proteína, está sustancialmente eliminado. Los mutantes de eliminación también incluyen mutantes en los que se ha alterado un gen de tal forma que normalmente no se expresa ARNm detectable o proteína bioactiva a partir del gen, aunque pueda estar presente cierta parte del material genético. Además, en algunas realizaciones, los mutantes con una eliminación o mutación que elimina o inactiva una actividad de una proteína (a menudo correspondiente a un dominio de proteína) que tiene dos o más actividades, se usan y se encuentran abarcados en la expresión "mutantes de eliminación". Los mutantes de sobreexpresión son células de tipo silvestre que se modifican genéticamente de tal forma que al menos un gen, más normalmente solo uno, en la célula madre de tumor sólido modificado se expresa a un nivel mayor en comparación con una célula en la que el gen no está modificado.

Las células madre de tumor sólido modificadas genéticamente pueden someterse a protocolos de cultivo tisular conocidos en la técnica (véanse las Patentes de Estados Unidos n.º 5.750.376 y 5.851.832, Spector et al., Cells: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1998)). Las células madre tumorales pueden modificarse genéticamente en cultivo para promover la diferenciación, la muerte celular, o la inmunogenicidad. Por ejemplo, las células madre tumorales pueden modificarse para potenciar la expresión de

productos que dirijan una respuesta inmunitaria contra el tumor sólido del paciente. Como alternativa, las células madre de tumor sólido pueden someterse a diversos protocolos de proliferación *in vitro* antes de la modificación genética. El protocolo usado depende del tipo de célula madre de tumor sólido o de descendencia de célula madre de tumor sólido modificada genéticamente deseada. Una vez que se ha sometido a las células al protocolo de diferenciación, se ensayan de nuevo respecto de la expresión de la proteína deseada. Las células que tienen el fenotipo deseado pueden aislarse e implantarse en receptores que necesiten la proteína o la molécula biológicamente activa que se expresa por la célula modificada genéticamente. Dichas moléculas pueden potenciar la regresión tumoral o inhibir la dispersión tumoral.

Modelos in vitro de desarrollo de tumores sólidos, modelos in vivo, y métodos para explorar los efectos de fármacos en las células madre de tumor sólido. Las células madre de tumor sólido y la descendencia de la célula madre de tumor sólido cultivada *in vitro* (véase el EJEMPLO 9) o *in vivo* (en el modelo de xenoinjerto descrito en el presente documento) puede usarse para la exploración de composiciones terapéuticas potenciales. Estas composiciones para el tratamiento de tumores sólidos puede aplicarse a estas células en cultivo a dosis diferentes, y puede controlarse la respuesta de estas células durante diversos periodos de tiempo. Las características físicas de estas células pueden analizarse observando las células mediante microscopía. La inducción de la expresión de niveles nuevos o aumentados de proteínas, tales como enzimas, receptores y otras moléculas de la superficie celular pueden analizarse con cualquier técnica conocida en la técnica; véase Clarke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11024-11028 (1995)) que pueda identificar la alteración del nivel de dichas moléculas. Estas técnicas incluyen inmunohistoquímica, usando anticuerpos (véanse los EJEMPLOS) contra dichas moléculas, o análisis bioquímico. Dicho análisis bioquímico incluye ensayos de proteínas, ensayos enzimáticos, ensayos de unión a receptor, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), análisis electroforético, análisis con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), transferencias de Western, y radioinmunoensayos (RIA). Los análisis de ácidos nucleicos, tales como las transferencias de Northern, pueden usarse para examinar los niveles de ARNm que codifican estas moléculas o PCR (véase el EJEMPLO 14).

Como alternativa, dichas células tratadas con estas composiciones farmacéuticas pueden trasplantarse en un animal (tal como en el modelo de xenoinjerto descrito en el presente documento), y examinarse su supervivencia, capacidad para formar tumores y características bioquímicas e inmunológicas.

Las células madre de tumor sólido y la descendencia de la célula madre de tumor sólido descrita en el presente documento pueden usarse en métodos para determinar el efecto de un agente biológico en células de tumores sólidos. La expresión "agente biológico" o "compuesto de ensayo" se refiere a cualquier agente (incluyendo un virus, proteína, péptido, aminoácido, lípidos, hidratos de carbono, ácido nucleico, nucleótido, fármaco, anticuerpo, profármaco u otra sustancia) que pueda tener un efecto en las células tumorales ya sea dicho efecto perjudicial, beneficioso u otro.

Para determinar el efecto de un compuesto de ensayo potencial en las células madre de tumor sólido, puede obtenerse un cultivo de células precursoras procedentes de células madre tumorales a partir de tejido de un sujeto, tal como un paciente con un tumor u otra enfermedad cancerosa, tal como un cáncer epitelial o un cáncer de mama. Una vez que las células madre de tumor sólido u otras poblaciones celulares deseadas se obtienen del sujeto, las células se cultivan *in vitro*. La selección del cultivo depende del compuesto de ensayo particular que se esté ensayando y de los efectos diagnósticos que desee obtener el personal del laboratorio.

Puede explorarse la capacidad de diversos agentes biológicos para aumentar, disminuir o modificar de algún otro modo el número y naturaleza de las células madre de tumor sólido y de la descendencia de la célula madre de tumor sólido. Por ejemplo, es posible explorar respecto de compuestos de ensayo que disminuyan la capacidad proliferativa de las células madre de tumor sólido, que puedan ser útiles para identificar agentes terapéuticos anti-cáncer. En estos ensayos, las células relevantes se cultivan en presencia de los compuestos de ensayo de interés y se ensayan respecto del grado de proliferación o de muerte celular que aparece.

Pueden determinarse los efectos de un compuesto de ensayo o combinación de compuestos de ensayo en la proliferación extensiva de células madre de tumor sólido y de su descendencia. Es posible explorar células de tumor sólido no tumorigénicas en las que ya se haya inducido la pérdida de la capacidad para proliferar de manera extensa antes de la exploración. También es posible determinar los efectos de los compuestos de ensayo en el proceso de proliferación aplicándolos a células madre de tumor sólido. En general, el compuesto de ensayo se solubiliza y añade al medio de cultivo o al ratón en el ensayo *in vivo* a diversas concentraciones para determinar el efecto de los compuestos de ensayo o del agente a cada dosis. El medio de cultivo se puede recargar con el compuesto de ensayo o agente biológico cada dos días en cantidades tales como para mantener la concentración del agente hasta cierto punto constante. De manera similar, el compuesto de ensayo puede volver a administrarse al ratón a diferentes intervalos para evaluar el efecto del compuesto a lo largo del tiempo.

Los cambios en la proliferación se observan por un aumento o disminución en el número de células que se forman o un aumento o disminución en el tamaño de los focos *in vitro*, o el tamaño del tumor *in vivo* (que es un reflejo de la velocidad de proliferación y de la velocidad de muerte celular, determinada mediante el número de células por foco o tamaño de tumor en el ratón). El efecto del compuesto de ensayo en las células madre tumorales se mide

determinando el número de células madre tumorales que persisten en el cultivo o en los tumores *in vivo* después del tratamiento con el compuesto de ensayo. Además de determinar el número de células madre tumorales, también se determinan los efectos del compuesto de ensayo en el estado del ciclo celular de la célula madre tumoral y la expresión de marcadores mediante citometría de flujo.

5 Los compuestos de ensayo o los agentes biológicos añadidos al medio de cultivo o inyectados en el ratón pueden estar a una concentración final en el intervalo de aproximadamente 10 pg/ml a 1 µg/ml, preferentemente de aproximadamente 1 ng/ml (o 1 ng/cc de sangre) a 100 ng/ml (o 100 ng/cc de sangre).

10 Los efectos de los compuestos de ensayo o agentes biológicos se identifican basándose en la diferencia significativa en relación a cultivos de control con respecto a criterios, tales como las proporciones de los fenotipos expresados, la viabilidad celular, la velocidad de proliferación, el número de células madre tumorales, la actividad de las células madre tumorales tras su trasplante *in vivo*, la actividad de las células madre tumorales tras su trasplante en cultivo, la distribución del ciclo celular de las células tumorales, y alteraciones en la expresión génica.

15 *Composiciones y métodos terapéuticos.* Una composición farmacéutica que contiene un ligando de Notch, un anticuerpo anti-Notch, u otro agente terapéutico que actúa como agonista o antagonista de proteínas en la tura de transducción/respuesta a señales de Notch puede administrarse mediante cualquier método eficaz. Por ejemplo, puede administrarse una solución fisiológicamente adecuada que contiene una concentración de agente terapéutico
20 anti-Notch por vía tópica, intraocular, parenteral, oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o a través de cualquier otro medio eficaz. En particular, el agente terapéutico anti-Notch puede inyectarse directamente en un cáncer o tejido tumoral diana con una aguja en cantidades eficaces para tratar a las células tumorales del tejido diana. Como alternativa, un cáncer o tumor presente en una cavidad corporal, tal como en el ojo, el tracto gastrointestinal, el tracto genitourinario (por ejemplo, la vejiga urinaria), el sistema pulmonar y bronquial y similares
25 puede recibir una composición fisiológicamente adecuada (por ejemplo, una solución, tal como suero salino o tampón fosfato, una suspensión, o una emulsión que es estéril) que contiene una concentración eficaz de un agente terapéutico anti-Notch mediante inyección directa con una aguja o a través de un catéter u otro tubo de administración situado en el cáncer u órgano hueco afectado por el tumor. Puede usarse un dispositivo de obtención de imágenes eficaz, tal como un sistema de visualización por rayos X, sonograma, o de fibra óptica para localizar el
30 tejido diana y guiar a la aguja o al tubo de catéter. En otra alternativa, puede administrarse una solución fisiológicamente adecuada que contenga una concentración eficaz de un agente terapéutico anti-Notch de manera sistémica a la circulación sanguínea para tratar un cáncer o tumor que no pueda alcanzarse directamente o que esté anatómicamente aislado.

35 Todas estas manipulaciones tienen en común el objetivo de situar al agente terapéutico anti-Notch en contacto suficiente con el tumor diana para permitir que el agente terapéutico anti-Notch entre en contacto, transduzca o transferte a las células tumorales (dependiendo de la naturaleza del agente). En una realización, pueden tratarse tumores sólidos presentes en los revestimientos epiteliales de los órganos huecos infundiéndolo la suspensión de vector en un órgano hueco relleno de fluido, o rociándolo o nebulizándolo dentro de un órgano hueco relleno de aire.
40 Por lo tanto, las células tumorales (tales como las células madre de tumor sólido) pueden estar presentes en o entre el tejido epitelial en el revestimiento del árbol bronquial pulmonar, el revestimiento del tracto gastrointestinal, el revestimiento del tracto reproductivo femenino, el tracto genitourinario, la vejiga, la vesícula biliar y otros tejidos de órganos accesibles al contacto con el agente terapéutico anti-Notch. En otra realización, el tumor sólido puede estar situado en o sobre el revestimiento del sistema nervioso central, tales como, por ejemplo, la médula espinal, las
45 raíces medulares o el cerebro, de tal forma que el agente terapéutico anti-Notch infundido en el fluido cefaloraquídeo entra en contacto con y transduce a las células del tumor sólido en ese espacio. (Por consiguiente, el agente terapéutico anti-Notch puede modificarse para que atraviese la barrera hematoencefálica usando métodos conocidos en la técnica). Un experto en la técnica de la oncología puede apreciar que el agente terapéutico anti-Notch puede administrarse al tumor sólido mediante inyección directa de la suspensión de vector al tumor de tal forma que el
50 agente terapéutico anti-Notch entra en contacto con y afecta a las células tumorales dentro del tumor.

Un experto en la materia de oncología puede entender que el vector se administre en una composición que comprende el vector junto con un transportador o vehículo adecuado para mantener la eficacia de la transducción o transfección del vector seleccionado y favorecer una infusión segura. Dicho transportador puede ser un tampón
55 fisiológico de pH equilibrado, tal como tampones fosfato, citrato o bicarbonato, una solución salina, una composición de liberación lenta y cualquier otra sustancia útil para colocar de manera segura y eficaz al agente anti-Notch en contacto con las células madre de tumor sólido que se van a tratar.

Al tratar a un paciente de cáncer que tiene un tumor sólido, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de
60 un agente terapéutico anti-Notch. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado una mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente. La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichas composiciones pueden terminarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La
65 relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren los compuestos que muestran elevados índices terapéuticos. Los datos

obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la CI_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al., en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, cap. 1, pág. 1 (1975)). El médico tratante sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir, o ajustar la administración debido a toxicidad, o a disfunciones orgánicas. Por el contrario, el médico tratante también sabrá ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuese adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el control del trastorno clínico de interés puede variar dependiendo de la gravedad de la afección que se va a tratar y de la ruta de administración. Véase, *Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 12ª Edición (CRC Press 1996); *Physicians' Desk Reference* 55ª Edición (2000)). La gravedad de la afección puede evaluarse por ejemplo evaluarse, en parte, mediante métodos de evaluación pronósticos adecuados. Además, la dosis y quizá la frecuencia de la dosis también varían de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. Puede usarse un programa comparable al discutido anteriormente en medicina veterinaria.

Dependiendo de las afecciones concretas que se estén tratando, los agentes pueden formularse y administrarse de manera sistémica o local. Las técnicas para formulación y administración pueden encontrarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición (Mack Publishing Co., Easton, PA). Las rutas adecuadas incluyen la administración oral, rectal, transdermal, vaginal, transmucosal, o intestinal; administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares, solo por nombrar solo algunas.

Para inyección, los agentes descritos en el presente documento pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para dicha administración transmucosal, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

Además de los principios activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, o soluciones. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden fabricarse de un modo que en sí sea conocido, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, disolución, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones para inyección oleosas adecuadas. Los disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulsa de sodio, sorbitol, o dextrano. De manera opcional, la suspensión puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones elevadamente concentradas.

Polinucleótidos y polipéptidos obtenidos a partir de células madre de tumor sólido. Un "polinucleótido" se refiere a una cadena de nucleótidos que pueden ser un ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico, oligonucleótido, nucleótido, o un fragmento de los mismos. Puede ser ADN o ARN de ADN genómico, ARNm, ADNc, o de origen sintético, bicatenario o monocatenario, y combinado con hidratos de carbono, lípidos, proteínas u otros materiales para efectuar una actividad concreta o formar una composición útil. Un "oligonucleótido" es sustancialmente equivalente a los términos amplímero, cebador, oligómero, elemento y sonda. El término "sonda" se refiere a una secuencia polinucleotídica capaz de hibridar con una secuencia diana para formar un complejo de sonda polinucleotídica/diana. Un "polinucleótido diana" se refiere a una cadena de nucleótidos con la que puede hibridar una sonda polinucleotídica mediante emparejamiento de bases. En algunos casos, las secuencias serán complementarias (sin desemparejamiento) cuando se alinean. En otros casos, puede haber un desemparejamiento de hasta un 10 %.

El ADN o ARN pueden aislarse a partir de la muestra de acuerdo con cualquiera de una serie de métodos bien conocidos para un experto en la materia. Por ejemplo, los métodos para la purificación de ácidos nucleicos se describen en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes*, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation (Elsevier, New York N.Y., 1993). "Muestra" se usa en su sentido

más amplio. Una muestra que contiene polinucleótidos o polipéptidos puede ser un fluido corporal; un extracto de células, cromosoma, orgánulo, o membrana aislada de una célula; ADN genómico, ARN, o ADNc en solución o unido a un sustrato, una célula; un tejido; una impresión de tejido; y similares.

- 5 El ARN total puede aislarse usando el reactivo TRIZOL (Life Technologies, Gaithersburg MD, EE.UU.), y el ARNm se aísla usando cromatografía en columna de oligo d(T) o perlas de vidrio. Como alternativa, cuando los polinucleótidos diana proceden de un ARNm, los polinucleótidos diana pueden ser un ADNc transcrito inversamente a partir de un ARNm, un ARN transcrito a partir de ese ADNc, un ADN amplificado a partir de ese ADNc, un ARN transcrito a partir del ADN amplificado, y similares. Cuando el polinucleótido diana procede de ADN, el polinucleótido diana puede ser
10 ADN amplificado a partir de ADN o ARN transcrito inversamente a partir de ADN.

Varias tecnologías producen agrupaciones de fragmentos de restricción de complejidad limitada para análisis electroforético, tales como métodos que combinan digestión doble con enzima de restricción con cebadores de fase (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea EP 0 534 858 A1), o métodos que seleccionan fragmentos de restricción con sitios lo más próximos a un extremo de ARNm definido (véase, por ejemplo, Prashar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 659-663 (1996)). Otros métodos muestrean agrupaciones de ADNc de muestra, tal como mediante secuenciación de suficientes bases (en cada uno de múltiples ADNc para identificar cada ADNc, o mediante secuenciación de marcadores cortos que se generan en posiciones conocidas en relación a un extremo de ARNm definido (véase, por ejemplo, Velculescu, Science 270: 484-487 (1995)).

Los métodos para modificar las abundancias de ARN y sus actividades actualmente se encuentran dentro de tres clase, ribozimas, especies antisentido (Solicitud de Patente PCT WO 88/09810), y aptámeros de ARN (Good et al., Gene Therapy 4: 45-54 (1997)). Las ribozimas son ARN que son capaces de catalizar las reacciones de escisión del ARN. (Solicitud de Patente PCT WO 90/11364). Los métodos de ribozimas implican exponer a una célula a, inducir la expresión en una célula de, etc. de dichas pequeñas moléculas de ribozima de ARN. (Grassi y Marini, Annals of Medicine 28: 499-510 (1996); Gibson, Cancer and Metastasis Reviews 15: 287-299 (1996)).

El término "antisentido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier composición que contiene una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la hebra "con sentido" de una secuencia de ácido nucleico específica. Las moléculas antisentido pueden producirse mediante cualquier método, incluyendo síntesis o transcripción. Una vez introducidas en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con secuencias naturales producidas por la célula para formar dúplex y para bloquear bien la transcripción o la traducción. La denominación "negativa" puede referirse a la hebra antisentido, y la denominación "positiva" puede referirse a la hebra con sentido.

Los oligonucleótidos pueden sintetizarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de sintetizadores de ADN automatizados (tales como los comercialmente disponibles a través de Biosearch, Applied Biosystems, etc.).

La "amplificación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico. La amplificación se lleva a cabo generalmente usando tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Dieffenbach CW y Dveksler GS, PCR Primer, a Laboratory Manual 1-5 (Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1995). La amplificación puede ser por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), o amplificación de ARN basada en T7.

Un "polipéptido" se refiere a un aminoácido, secuencia de aminoácidos, oligopéptido, péptido, o proteína o porciones de los mismos ya sean de origen natural o sintético.

Los métodos para medir directamente la actividad proteica se conocen bien por los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, métodos que dependen de tener un ligando de anticuerpo para la proteína, tales como transferencia de Western; véanse, por ejemplo, Bumette, A. Anal. Biochem. 112: 195-203 (1981). Dichos métodos también incluyen ensayos de actividad enzimática, que están disponibles para la mayoría de las dianas farmacológicas de proteína bien estudiadas. La detección de proteínas puede lograrse mediante anticuerpos (véanse los EJEMPLOS).

La expresión "determinante antigénico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a aquel fragmento de una molécula (es decir, un epítipo) que efectúa el contacto con un anticuerpo particular. Cuando se usa una proteína o un fragmento de una proteína para inmunizar a un animal hospedador, muchas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a determinantes antigénicos (regiones dadas o estructuras tridimensionales en la proteína). Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el inmunógeno usado para provocar la respuesta inmune) por la unión a un anticuerpo.

Las proteínas aisladas a partir de una población enriquecida de células madre de tumor sólido o de células de tumor sólido aisladas pueden separarse mediante sistemas de electroforesis en gel en dos dimensiones. La electroforesis en gel en dos dimensiones se conoce bien en la técnica e implica normalmente isoelectroenfoco a lo largo de una

primera dimensión seguida de SDS-PAGE a lo largo de una segunda dimensión. Véase, por ejemplo, Hames et al, Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach (IRL Press, Nueva York 1990); Lander, Science 274:536-539 (1996). Los diagramas de electroforesis resultantes pueden analizarse mediante numerosas técnicas, incluyendo técnicas de espectrometría de masas, análisis por transferencia de Western e inmunotransferencias usando anticuerpos policlonales y monoclonales, y microsecuenciación interna y N-terminal. Usando estas técnicas, es posible identificar una fracción sustancial de todas las proteínas producidas en unas condiciones fisiológicas dadas, incluyendo en células (por ejemplo, en células madre de tumor sólido) expuestas a un fármaco o en células modificadas mediante, por ejemplo, eliminación o sobreexpresión de un gen específico.

Bibliotecas de ADNc. Las células madre de tumor sólido purificadas, la descendencia de las células madre de tumor sólido, las células no tumorigénicas y las células tumorales no fraccionadas pueden usarse para producir matrices o bibliotecas de ADNc usando métodos conocidos en la técnica (véase, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., (Wiley Interscience, Nueva York, 1993)) para identificar nuevas dianas farmacológicas potenciales.

La biología molecular comprende una gran variedad de técnicas para el análisis de ácidos nucleicos y proteínas, muchas de las cuales forman la base de pruebas diagnósticas clínicas. Estas técnicas incluyen análisis de hibridación de ácido nucleico, análisis de enzimas de restricción, análisis de secuencia genética, y separación y purificación de ácidos nucleicos y proteínas (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). Muchas técnicas de biología molecular implican llevar a cabo numerosas operaciones en una gran cantidad de muestras. Para una orientación acerca de la genómica y otros métodos biológicos útiles en la presente invención, véase Birren et al., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Volumen 1, Analyzing DNA (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1997); Birren et al., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Volumen 2, Detecting Genes (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1998); Birren et al., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Volumen 4, Mapping Genomes (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999).

El análisis de hibridación de ácido nucleico implica generalmente la detección de un número muy pequeño de ácidos nucleicos diana específicos (ADN o ARN) con sondas entre una gran cantidad de ácidos nucleicos no diana. Se han llevado a cabo múltiples análisis de hibridación de muestras de ácido nucleico en diversos formatos de filtro y soporte sólido. La hibridación por "transferencia de puntos", implica la unión no covalente de ADN diana a un filtro, que posteriormente se hibridan con sondas marcadas. La hibridación por "transferencia de puntos" se ha desarrollado además para múltiples análisis (Solicitud de Patente Europea EP 0 228 075) y para la detección de clones solapantes y la construcción de mapas genómicos (Patente de Estados Unidos 5.219.726). Otro formato, la hibridación denominada de "sándwich", implica unir sondas oligonucleotídicas de manera covalente a un soporte sólido y usarlas para capturar y detectar múltiples dianas de ácido nucleico (Patente de Estados Unidos n.º 4.751.177; Solicitud Internacional de Patente PCT WO 90/01564). Las versiones multicanal de estos formatos se denominan "transferencias inversas por puntos".

Se conocen métodos en la técnica para amplificar señales usando grupos indicadores sensibles (enzimas, fluoróforos, radioisótopos, etc.) y sistemas de detección asociados (fluorómetros, luminómetros, contadores de fotones, contadores de centelleo, etc.). Estos métodos pueden combinarse con métodos de amplificación, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias de ácido nucleico diana. Véase, Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (Academic Press, 1990).

Micromatrices. Imitando la hibridación *in situ* en algunos aspectos, se están desarrollando nuevas técnicas para llevar a cabo múltiples análisis de hibridación de muestras de ácido nucleico en dispositivos multicanal o de matriz en formato microscópico (por ejemplo, microplacas de ADN) (véase, Barinaga, Science 253: 1489 (1991); Bains, Bio/Technology 10: 757-758 (1992)). Se proporciona orientación acerca del uso de micromatrices por Wang, E et al., Nature Biotechnology 18; 457-459 (2000); Diehn M et al., Nature Genetics 25: 58-62 (2000).

Las micromatrices se conocen en la técnica y consisten en una superficie a la que las sondas que corresponden en secuencia a productos génicos (por ejemplo, ADNc, oligonucleótidos, ARNm, ARNc, polipéptidos, y fragmentos de los mismos), pueden hibridarse o unirse específicamente en una posición conocida. En una realización, la micromatriz es una matriz en la que cada posición representa un sitio de unión discreto para un producto codificado por un gen (por ejemplo, una proteína o ARN), y en el que hay presentes sitios de unión para productos de la mayoría o prácticamente la mayoría de los genes en el genoma del organismo.

Los polinucleótidos, polipéptidos, o análogos se unen a un soporte sólido o sustrato, que puede estar hecho de vidrio, plástico (por ejemplo, polipropileno, nailon), poliacrilamida, nitrocelulosa, u otros materiales. Un "sustrato" se refiere a cualquier soporte rígido o semi-rígido adecuado al que se unen los polinucleótidos o polipéptidos e incluye membranas, filtros, microplacas, portaobjetos, obleas, fibras, perlas magnéticas o no magnéticas, geles, capilares u otros tubos, placas, polímeros, y micropartículas con diversas formas de superficie, incluyendo pocillos, surcos, pinchos, canales y poros. Los polinucleótidos pueden inmovilizarse sobre un sustrato mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente, los sustratos son ópticamente transparentes.

Actualmente hay disponible diversos métodos para producir matrices de macromoléculas biológicas, tales como matrices de moléculas de ácido nucleico o proteínas. Un método para producir matrices ordenadas de ADN sobre una membrana porosa es un método de "transferencia por puntos" o de "transferencia de ranura". Una técnica más eficaz empleada para producir matrices ordenadas de fragmentos usa una matriz de pinchos sumergidos en los pocillos, por ejemplo, los 96 pocillos de una placa de microtitulación, para transferir una matriz de muestras a un sustrato, tal como una membrana porosa. Un método alternativo para crear matrices ordenadas de secuencias de ácidos nucleicos se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.143.854 (de Pirrung) y también en Fodor et al., Science 251:767-773 (1991). El método implica sintetizar diferentes secuencias de ácido nucleico en diferentes regiones discretas de un soporte. Khrapko et al., DNA Sequence 1:375-388 (1991) describe un método para producir una matriz de oligonucleótidos punteando ADN sobre una capa fina de poliacrilamida, manualmente con una micropipeta. La Patente de Estados Unidos n.º 5.807.522 (de Brown et al.) describe métodos para fabricar micromatrices de muestras biológicas dispersando un volumen conocido de un reactivo en cada posición de la matriz seleccionada, tocando con un dispensador capilar sobre el soporte en condiciones eficaces para extraer un volumen definido de líquido sobre el soporte.

Los punteadores pueden usar pinchos, chorro de tinta, y otras tecnologías para depositar muestras sobre el material de soporte. Varios de los métodos más comunes utilizan pinchos metálicos, que pueden ser sólidos o estar separados. Cuando se sumergen los pinchos en los pocillos que contienen los compuestos de interés, cada uno capta una pequeña cantidad del material. Entonces se pone en contacto el pincho con el soporte sólido y se administra un volumen de un nanolitro en la localización deseada. En las puntas separadas (también conocidas como plumas) una ranura cortada en la cabeza del pincho funciona como depósito para el compuesto que se está punteando. Los pinchos de pluma se usan con más frecuencia con portaobjetos de vidrio, mientras que los pinchos sólidos se usan normalmente para puntear membranas. Amersham Pharmacia Biotech, GeneMachines, y otras compañías ofrecen robots de punteo.

La tecnología de chorro de tinta proporciona otro método para puntear micromatrices. Adaptado a partir de la industria de la impresión y rediseñado para su uso en aplicaciones biotecnológicas, este usa osciladores de cristal piezoeléctricos y un sistema de orientación de electrodos para depositar el compuesto en una ubicación precisa sobre el portaobjetos o membrana. Empresas tales como Cartesian Technologies y ProtoGene Laboratories usan esta tecnología.

Un método para unir los ácidos nucleicos a una superficie es mediante impresión sobre placas de vidrio, tal como se describe de manera general en la Publicación PCT WO 95/35505; DeRisi et al., Nature Genetics 14:457-460 (1996); Shalon et al., Genome Res. 6:639-645 (1996), y Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10614-10619 (1995). Otro método para producir micromatrices es produciendo matrices de oligonucleótidos de alta densidad. Se conocen técnicas para producir matrices que contienen miles de oligonucleótidos complementarios a secuencias definidas, en ubicaciones definidas sobre una superficie usando técnicas fotolitográficas para la síntesis *in situ* (véase Fodor et al., Science 251:767-773 (1991); Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5022-5026 (1994); Lockhart et al., Nature Biotech 14:1675 (1996); Patentes de Estados Unidos n.º 5.578.832; 5.556.752; y 5.510.270).

Patente de Estados Unidos n.º 6.110.426 (de Shalon et al) un método y un aparato para fabricar micromatrices de muestras biológicas para ensayos de exploración a gran escala, tales como matrices de muestras de ADN para su uso en ensayos de hibridación de ADN para aplicaciones de investigación genética y diagnósticos. La Patente de Estados Unidos n.º 6.221.674 (de Sluka et al.) divulga un proceso descrito para aplicar zonas de reactivo espacialmente definidas a una fase sólida que se caracteriza en que se pone en contacto un líquido que contiene un reactivo de unión absorbente con zonas espacialmente definidas de una fase sólida que comprende una superficie esencialmente continua de metal o de óxido metálico durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la formación de uniones absorbentes entre el reactivo de unión y la fase sólida. En la Solicitud PCT WO 92/10092 se describe un proceso que puede usarse para generar diversas estructuras diferentes sobre un soporte de vidrio mediante compuestos fotorreactivos e irradiación usando máscaras. En la Patente de Estados Unidos n.º 4.877.745 se describe un proceso en el que pueden aplicarse puntos funcionalizados de manera diferente a soportes de plástico mediante chorro de tinta.

Entre los vendedores de micromatrices y uso de tecnología de micromatrices se encuentran Affymetrix, Inc. (EE.UU.), NimbleGen Systems, Inc. (Madison, Wisconsin, EE.UU.), e Incyte Genomics (EE.UU.) (que producen micromatrices para instalaciones centrales en grandes departamentos industriales y académicos); Agilent Technologies (EE.UU.) y Graffinity Pharmaceutical Design, GmbH (Alemania) (que proporcionan servicios específicos, tales como matrices de impresión y de huella diseñadas y usadas por investigadores individuales); y CLONTECH Laboratories (Becton Dickinson Bioscience) y BioRobotics, Ltd. (Reino Unido) (que proporcionan las herramientas básicas necesarias para investigadores individuales para que lleven a cabo el proceso completo de producción de micromatrices, incluyendo la impresión). Véase, Gwynne P y Heebner G, "DNA Chips and Microarrays" Science (2001).

A diferencia de las superficies plásticas, las superficies de metal y de óxido de metal tienen la ventaja de que pueden recubrirse con una capa de matriz definida de manera exacta mediante técnicas de auto-montaje. Se forma una monocapa autoensamblada (SAM), por ejemplo, cuando se adsorben alquiltioles sobre una superficie de oro,

basándose la organización espontánea de dicha monocapa densamente empaquetada en fuertes interacciones específicas entre el material de soporte y el adsorbente. Nuzzo et al., J. Am. Chem. Soc. 105: 4481 (1983). De este modo es posible aplicar una monocapa definida de manera exacta de una matriz de unión a la superficie de metales, tales como, por ejemplo, oro o plata. Además, la capacidad de unión específica de las fases sólidas autoensambladas puede optimizarse adicionalmente mediante la dilución de los reactivos de fase sólida específicos tal como se describe en el documento EP-A-0 515 615.

El recubrimiento de superficies metálicas con microestructuras basadas en monocapas autoensambladas también se conoce y puede usarse para unir componentes aislados a partir de células madre de tumor sólido. Whitesides et al., Langmuir 10 (1994) 1498-1511 describe un proceso en el que se estampan los reactivos sobre una superficie de metal noble mediante un sello de silicona microestructurado especial. Esto permite que se generen monocapas microestructuradas con zonas que están espacialmente separadas entre sí. Las microestructuras de monocapas autoensambladas sobre superficies de metal noble pueden formarse mediante irradiación a través de máscaras de sustratos cuyo área completa esté cubierta con tioles y posteriormente lavando. Hemminger et al., Langmuir 10: 626-628 (1994). También se forman en este proceso zonas espacialmente separadas que están funcionalizadas de manera idéntica. Una posibilidad adicional para producir puntos de reactivo es aplicando en primer lugar puntos de oro a un soporte que ya están separados espacialmente entre sí y que posteriormente se recubren con reactivos.

La unión de analitos a una matriz de fase sólida funcionalizada descrita en el presente documento puede, por ejemplo, detectarse mediante microscopía de barrido de fluorescencia confocal o mediante espectroscopía de resonancia de plasmón. Ruthenhausler B et al., Nature, 332: 615-617 (1988).

La Patente de Estados Unidos n.º 6.228.659 describe un aparato para producir diversas matrices de regiones de reactivo. Un montaje de dispensación en el aparato tiene diversos cabezales que están espaciados para depositar reactivos en posiciones seleccionadas en distintas zonas de matriz en un sustrato.

Pueden emplearse matrices de transcrito para analizar el estado transcripcional en una célula, y especialmente para medir los estados transcripcionales de células expuestas a niveles graduados de una terapia de interés, tales como niveles graduados de un fármaco de interés o a niveles graduados de una patología de interés. En una realización, las matrices de transcrito se producen hibridando polinucleótidos marcados de manera detectable que representan a los transcritos de ARN presentes en una célula (por ejemplo, ADNc marcado fluorescentemente sintetizado a partir de ARNm total) a una micromatriz. En realizaciones alternativas, la sonda de ADNc o ARN puede sintetizarse en ausencia de marcador detectable y puede marcarse posteriormente, por ejemplo, incorporando dNTP o rNTP biotinilado, o algunos medios similares (por ejemplo, fotorreticulando un derivado de psoraleno de biotina a ARN), seguido de la adición de estreptavidina marcada (por ejemplo, estreptavidina conjugada a ficoeritrina) o el equivalente. El marcador para la sonda puede seleccionarse entre el grupo que consiste en biotina, y marcadores fluorescentes, radioactivos y enzimáticos. Cuando se usan sondas marcadas fluorescentemente, se conocen muchos fluoróforos adecuados, incluyendo fluoresceína, lisamina, ficoeritrina, Rodamina (Perkin Elmer Cetus), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham) y otros (véase, por ejemplo, Kricka, Nonisotopic DNA Probe Techniques (Academic Press San Diego, Calif., 1992). Se apreciará que se seleccionen pares de fluoróforos que tengan distintos espectros de emisión de tal forma que puedan distinguirse fácilmente. En otra realización, se usa un marcador distinto de un marcador fluorescente. Por ejemplo, puede usarse un marcador radioactivo, o un par de marcadores radioactivos con distintos espectros de emisión (véase Zhao et al., Gene 156:207 (1995); Pietu et al., Genome Res. 6:492 (1996); véase también, el EJEMPLO 21). Por ejemplo, puede usarse ³²P.

Estos métodos para unir transcritos unen normalmente secuencias polinucleotídicas específicas a zonas específicas muy pequeñas de un soporte sólido, tales como micropocillos de una microplaca de ADN. Estos formatos de hibridación son versiones a escala microscópica de los sistemas de hibridación de "transferencia inversa por puntos" y de "sándwich". La hibridación en formato microscópico puede usarse para llevar a cabo "secuenciación mediante hibridación" (véase Barinaga, Science 253: 1489 (1991); Bains, Bio/Technology 10: 757-758 (1992). La secuenciación mediante hibridación hace uso de todos los posibles oligómeros de n nucleótidos (n-meros) para identificar a los n-meros en una muestra de ADN desconocida, que posteriormente se alinean mediante un algoritmo de análisis para producir la secuencia de ADN (véase, Patente de Estados Unidos n.º 5.202.231; véase también, Solicitud de Patente de Reino Unido GB 8810400 (1988); Southern et al., Genomics 13: 1008 (1992); Fodor et al., Nature 364: 555-556 (1993); Fodor et al., Science 251: 767-773 (1991); Patente de Estados Unidos N° 5.143.854.

Pueden sintetizarse sondas, total o parcialmente, sobre la superficie de un sustrato usando un procedimiento de acoplamiento químico y un aparato de impresión piezoeléctrico, tal como aquel descrito en la Publicación PCT WO 95/251116 (Baldeschweiler et al.). Como alternativa, la sonda puede sintetizarse sobre una superficie de sustrato usando un dispositivo electrónico de autodireccionamiento que controle cuando se añaden los reactivos (Patente de Estados Unidos n.º 5.605.662).

Además, las sondas no tienen por qué estar unidas directamente al sustrato, sino que pueden estar unidas al sustrato a través de un grupo enlazador. Los grupos enlazadores tienen normalmente de aproximadamente 6 a 50 átomos de longitud para proporcionar exposición a la sonda polinucleotídica unida. Los grupos enlazadores preferidos incluyen oligómeros de etilenglicol, diaminas, diácidos y similares. Los grupos reactivos sobre la superficie

del sustrato reaccionan con una de las partes terminales del enlazador para unir el enlazador al sustrato. La otra parte terminal del enlazador se funcionaliza para la unión de la sonda polinucleotídica.

Se conocen dispositivos y sistemas informáticos para formar y usar matrices de materiales sobre una microplaca o sustrato. Por ejemplo, las Publicaciones Internacionales PCT WO 92/10588 y WO 95/11995, describen técnicas para secuenciar o comprobar la secuencia de ácidos nucleicos y otros materiales. Las matrices para llevar a cabo estas operaciones pueden formarse en matrices de acuerdo con los métodos de, por ejemplo, las técnicas pioneras descritas en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.445.934, 5.384.261 y 5.571.639. Se han ideado métodos mejorados para formar matrices de péptidos, polinucleótidos y otras secuencias poliméricas de alta densidad en un breve periodo de tiempo usando síntesis de fase sólida combinatoria. La tecnología de síntesis de polímero inmovilizado a muy gran escala (VLSIPS) ha avanzado en gran medida la síntesis de polímeros de fase sólida combinatoria y ha pavimentado el camino para la aplicación clínica de microplacas de matriz de ácido desoxirribonucleico (ADN) tales como aquellas vendidas con el nombre GENECHIP™; Kozar et al., *Nature Medicine* 2: 753-759 (1996). La tecnología VLSIPS se divulga en la Patente de Estados Unidos n.º 5.143.854, en las Solicitudes Internacionales de Patente PCT WO 90/15070, WO 92/10092; y WO 95/11995, y Fodor et al., *Science* 251:767-777(1991).

Las condiciones de hibridación y lavado de ácidos nucleicos se seleccionan de tal forma que la sonda se "une específicamente" o "hibrida específicamente" a un sitio de la matriz específico, es decir, la sonda hibrida, forma un dúplex o se une a un sitio de matriz de secuencia con una secuencia de ácido nucleico complementaria pero no hibrida con un sitio con una secuencia de ácido nucleico no complementaria. Tal como se usa en el presente documento, una secuencia polinucleotídica se considera complementaria a otra cuando, si el más corto de los polinucleótidos es igual o menor a 25 bases, no hay desemparejamientos usando reglas de emparejamiento de bases convencional o, si el más corto de los polinucleótidos tiene una longitud mayor a 25 bases, no hay más de un 5 % de desemparejamiento. Preferentemente, los polinucleótidos son perfectamente complementarios (sin desemparejamientos). Puede demostrarse que las condiciones de hibridación específicas dan como resultado hibridación específica llevando a cabo un ensayo de hibridación que incluye controles negativos. Las condiciones de hibridación óptimas dependen de la longitud (por ejemplo, oligómero frente a polinucleótido mayor de 200 bases) y del tipo (por ejemplo, ARN, ADN, APN) de sonda marcada y del polinucleótido u oligonucleótido inmovilizado. Los parámetros generales para las condiciones de hibridación específica (es decir, rigurosa) para ácidos nucleicos se describen en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York 1987). También se proporcionan condiciones de hibridación útiles en, por ejemplo, Tijessen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes*, (Elsevier Science Publishers B.V., 1993) y Kricka, *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, (Academic Press, San Diego, Calif., 1992).

Cuando se produce e hibrida ADNc complementario al ARN de una célula a una micromatriz en condiciones de hibridación adecuadas, el nivel de hibridación al sitio en la matriz correspondiente a cualquier gen particular reflejará la prevalencia en la célula del ARN transcrito a partir de ese gen. Por ejemplo, cuando se hibrida a una matriz ADNc marcado de manera detectable (por ejemplo, con un fluoróforo) complementario al ARNm celular total, el sitio sobre la matriz correspondiente a un gen (es decir, capaz de unir de manera específica el producto del gen) que no se transcribe en la célula tendrá poca o ninguna señal (por ejemplo, señal fluorescente), y un gen para el que el ARNm codificado es prevalente tendrá una señal relativamente fuerte.

La Patente de Estados Unidos n.º 6.183.968 (de Bandman et al.) divulga sondas polinucleotídicas que pueden usarse como elementos de matriz hibridables en una micromatriz, teniendo cada una de las sondas polinucleotídicas al menos una parte de un gen que codifica una proteína asociada con la proliferación celular o con un receptor.

Cuando se usan sondas marcadas fluorescentemente, las emisiones de fluorescencia en cada sitio de una matriz de transcrito puede detectarse preferentemente mediante microscopía láser confocal de barrido. En una realización, se lleva a cabo un barrido usando la línea de excitación adecuada para cada uno de los dos fluoróforos usados. Como alternativa, puede usarse un láser que permita la iluminación simultánea del espécimen a longitudes de onda específicas para los dos fluoróforos y pueden analizarse las emisiones de los dos fluoróforos de manera simultánea (véase Shalon et al., *Genome Research* 6:639-645 (1996)). Las señales quedan registradas y, preferentemente, se analizan con un ordenador, usando métodos comercialmente disponibles. Puede usarse el programa de clasificación de la abundancia descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.840.484 para tabular y clasificar por frecuencia los transcritos de ARNm correspondientes a cada gen identificado. Ya que algunas de las secuencias polinucleotídicas se identifican únicamente basándose en niveles de expresión, no es esencial saber a priori la función de un gen particular en las células madre de tumor sólido.

Pueden obtenerse comparaciones de imágenes de transcrito mediante métodos bien conocidos para los expertos en la materia. Pueden obtenerse y compararse niveles e imágenes de transcritos, por ejemplo, mediante un ensayo de expresión génica diferencial basado en una hibridación cuantitativa de clones de ADN dispuestos en forma de matriz (Nguyen et al., *Genomics* 29:207-216 (1995), basado en el análisis en serie de la tecnología de expresión génica (SAGE) (Velculescu et al., *Science* 270:484-487 (1995)), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (Peng et al., *Science* 257:967-971(1992), basado en un protocolo de amplificación diferencial (Patente de Estados Unidos n.º 5.545.522), o basado en análisis electrónico, tal como análisis de transcrito génico comparativo (Patente de Estados

Unidos n.º 5.840.484) o el programa de análisis de la expresión génica GEMTOOLS (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, Calif., EE.UU.). Preferentemente, las comparaciones entre dos o más perfiles de transcrito se efectúan electrónicamente.

- 5 La Patente de Estados Unidos n.º 6.215.894 divulga un sistema para escanear matrices de biochips que incluye un único identificador de imagen de matriz para cada matriz, y un registro almacenado informáticamente que corresponde a cada identificador y que contiene los parámetros del experimento en la matriz identificada por el identificador. El sistema incluye además medios para acceder a una biblioteca de protocolo para recuperar los
10 protocolos de escaneo asociados con las matrices identificadas y después escanear las matrices de acuerdo con los protocolos respectivos. Los mapas de imagen resultantes generados por los escáneres se almacenan en localizaciones correspondientes a los identificadores asociados.

La medición del estado traduccional puede efectuarse de acuerdo con varios métodos. Por ejemplo, puede llevarse a cabo el control del genoma completo de proteínas (es decir, el "proteoma") construyendo una micromatriz en las que
15 los sitios de unión comprendan anticuerpos inmovilizados, preferentemente monoclonales, específicos para diversas especies de proteína codificadas por el genoma de la célula.

Uso de micromatrices. Las micromatrices descritas anteriormente pueden emplearse en varias aplicaciones, incluyendo el diagnóstico del cáncer de tumores sólidos, pronósticos y regímenes de tratamiento, descubrimiento y
20 desarrollo de fármacos, estudios toxicológicos y de carcinogenicidad, ciencia forense, farmacogenómica y similares.

En una realización, la micromatriz se usa para controlar la progresión de la enfermedad. Los médicos pueden evaluar y catalogar las diferencias en la expresión génica entre tejidos sanos y cancerosos analizando cambios en patrones de expresión génica en comparación con células madre de tumor sólido del paciente. Por lo tanto, puede
25 diagnosticarse el cáncer en estadios más tempranos antes de que el paciente se haga sintomático. La invención también puede usarse para controlar la eficacia del tratamiento. Para algunos tratamientos con efectos secundarios conocidos, se emplea la micromatriz para "afinar" el régimen de tratamiento. Se establece una dosis que cause un cambio en los patrones de expresión genética indicativos de un tratamiento satisfactorio. Se evitan los patrones de expresión asociados con efectos secundarios no deseados. Esta estrategia puede ser más sensible y rápida que
30 esperar a que el paciente muestre una mejoría no adecuada, o a que manifieste efectos secundarios, antes de alterar el ciclo de tratamiento.

Como alternativa, pueden usarse modelos animales que imitan a una enfermedad, en lugar de pacientes, para caracterizar los perfiles de expresión asociados con una enfermedad o afección concreta. Estos datos de expresión
35 génica pueden ser útiles para diagnosticar y controlar el trascurso de una enfermedad en un paciente, para determinar dianas génicas para intervención, y para ensayar nuevos regímenes de tratamiento.

Asimismo, los investigadores pueden usar la micromatriz para explorar rápidamente grandes números de moléculas candidatas a fármaco, buscando aquellas que produzcan un perfil de expresión similar a aquellos de fármacos
40 terapéuticos conocidos, con la esperanza de que las moléculas con el mismo perfil de expresión puedan tener probablemente efectos terapéuticos similares. Por lo tanto, la invención proporciona los medios para determinar el modo de acción molecular de un fármaco.

Las Patentes de Estados Unidos n.º 6.218.122, 6.165.709, y 6.146.830 (todas de Fiend et al.) divulgan métodos para
45 identificar dianas de un fármaco en una célula comparando (i) los efectos del fármaco en una célula de tipo silvestre, (ii) los efectos en una célula de tipo silvestre de modificaciones para una diana putativa del fármaco, y (iii) los efectos del fármaco en una célula de tipo silvestre a la que se le ha modificado la diana putativa del fármaco. En diversas realizaciones, pueden determinarse los efectos en la célula midiendo la expresión génica, las abundancias de proteínas, las actividades de proteínas, o una combinación de dichas medidas. En diversas realizaciones, pueden
50 efectuarse modificaciones para una diana putativa en la célula mediante modificaciones en los genes que codifican la diana, modificaciones en las abundancias de los ARN que codifican la diana, modificaciones en las abundancias de proteínas diana, o modificaciones para actividades de las proteínas diana. La presente invención proporciona una mejora para estos métodos de descubrimiento de fármacos proporcionando las células madre de tumor sólido tumorigénicas, para un programa de descubrimiento de fármacos más preciso.

Un "perfil de expresión" comprende la medida de diversos constituyentes celulares que indican aspectos del estado biológico de una célula. Dichas medidas pueden incluir, por ejemplo, abundancias o niveles de actividad de ARN o
60 proteína. Se miden aspectos del estado biológico de una célula de un sujeto, por ejemplo, el estado transcripcional, el estado traduccional, o el estado de actividad. La recogida de estas medidas, opcionalmente representadas de manera gráfica, se denomina "perfil diagnóstico". Los aspectos del estado biológico de una célula que son similares a aquellos medidos en el perfil diagnóstico, por ejemplo, el estado transcripcional, se miden en un sujeto o sujetos análogos en respuesta a una patología relacionada conocida o, si se está controlando la eficacia terapéutica, en respuesta a un efecto conocido relacionado de una terapia. La recogida de estas medidas, opcionalmente representadas de manera gráfica, se denomina en el presente documento como "perfil de respuesta". Los perfiles de
65 respuesta se interpolan para predecir perfiles de respuesta para todos los niveles de actividad proteica dentro del intervalo de actividad proteica medida. En los casos donde se va a controlar la eficacia terapéutica, puede

relacionarse el perfil de respuesta con un efecto beneficioso, un efecto adverso, tal como un efecto tóxico, o a efectos tanto beneficiosos como adversos.

Como se apreciará comúnmente, las actividades de proteínas son el resultado de las abundancias proteicas; las abundancias de proteínas son el resultado de la traducción de ARNm (equilibrada frente a la degradación de proteínas); y las abundancias de ARNm son el resultado de la transcripción de ADN (equilibrada frente a la degradación de ARNm). Por lo tanto, las modificaciones a nivel genético de un constituyente de ADN celular altera las abundancias de ARNm transcrito, las abundancias de proteínas traducidas, y en última instancia las actividades de proteínas. Las modificaciones a nivel de ARN alteran la abundancia de ARN y las abundancias y actividades de proteínas. Las modificaciones a nivel de proteína alteran las abundancias y actividades de proteínas. Finalmente, las modificaciones de la actividad de proteínas son los métodos de modificación más usados como diana. Como se apreciará comúnmente, son en última instancia las actividades de proteínas (y las actividades de ARN catalíticamente activos) las que causan las transformaciones y efectos celulares. Asimismo, la mayoría de los fármacos actúan alterando las actividades de proteínas.

En una realización, se hibridan ADNc de dos células diferentes (siendo una las células madre de tumor sólido de la invención) a los sitios de unión de la micromatriz. En el caso de eficacia terapéutica (por ejemplo, en respuesta a fármacos) se expone una célula a una terapia y otra célula del mismo tipo no se expone a la terapia. En el caso de patologías, una célula muestra un nivel particular de patología y otra célula del mismo tipo no muestra la patología (o el nivel de la misma). El ADNc procedente de cada uno de los dos tipos celulares se marca de manera distinta para que puedan distinguirse. En una realización, por ejemplo, se sintetiza ADNc de una célula tratada con un fármaco (o expuesta a una alteración de una ruta) usando un dNTP marcado con fluoresceína, y el ADNc de una segunda célula, no expuesta a fármaco, se sintetiza usando un dNTP marcado con rodamina. Cuando se mezclan e hibridan los dos ADNc a la micromatriz, la intensidad de señal relativa de cada conjunto de ADNc se determina para cada sitio en la matriz, y se detecta cualquier diferencia relativa en la abundancia de un ARNm particular. Se ha descrito el uso de un marcado fluorescente de dos colores y de un esquema de detección para definir alteraciones en la expresión génica, por ejemplo, en Shena et al., Science 270:467-470 (1995). Una ventaja de usar ADNc marcado con dos fluoróforos diferentes es que puede efectuarse una comparación directa y controlada de manera interna de los niveles de ARNm correspondientes a cada gen dispuesto de forma matricial en dos estados celulares, y las variaciones debidas a diferencias menores en las condiciones experimentales (por ejemplo, condiciones de hibridación) no afectarán a los análisis posteriores. Se proporciona orientación adicional en el EJEMPLO 21.

La Patente de Estados Unidos n.º 6.194.158 (de Kroes et al) es para un ensayo diagnóstico de un cáncer con una microplaca de ADN de secuencias conocidas para medir los niveles de expresión de determinadas secuencias en una célula para determinar si la expresión está regulada positiva o negativamente. La microplaca de ADN que comprende secuencias de nucleótidos capaces de hibridar a uno o más miembros de un panel de secuencias de ADN puede sintetizarse usando técnicas comúnmente disponibles. El ARNm se aísla de una célula normal no cancerosa y una célula cancerosa y se hibrida a la microplaca de ADN que comprende una o más de las secuencias del panel. Entonces se detecta la hibridación mediante cualquiera de los métodos disponibles. De este modo, se detectan secuencias que están bien sobreexpresadas o expresadas de menos en una célula cancerosa en comparación con una célula normal. De manera similar, el ARNm de una célula cancerosa que se ha puesto en contacto con un compuesto puede hibridarse a secuencias en la microplaca de ADN para determinar si ese compuesto afecta a la expresión de una secuencia particular. La presente invención proporciona una mejora frente a este método en tanto que la "célula cancerosa" a partir de la cual puede aislarse el ARNm es la célula madre de tumor sólido tumorigénica descrita en el presente documento.

Los perfiles de expresión génica de células madre purificadas pueden dar pistas acerca de los mecanismos moleculares del comportamiento de las células madre. Tersikh AV et al., Proc Natl Acad Sci USA 98(14): 7934-7939 (2001) analizaron células madre hematopoyéticas (HSC) enriquecidas mediante comparación con tejido normal y neuroesferas de ratón (una población enriquecida en gran medida para células progenitoras neurales) mediante comparación con células neurales diferenciadas de manera terminal, usando técnicas de micromatrices de ADNc e hibridación *in situ*, identificando de este modo candidatos a genes reguladores potenciales. La invención proporciona un método mejorado para descubrimiento de fármacos frente a los métodos de Tersikh, en tanto que el uso de las células madre de tumor sólido descrito en el presente documento puede proporcionar un conjunto distinto de dianas farmacológicas cuando se comparan con el tejido normal de un paciente (tal como del área del tumor sólido) o se compara con las otras poblaciones de células obtenidas del tumor sólido.

Se conocen varios otros métodos para utilizar microplacas de ADN, incluyendo los métodos descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.744.305; 5.733.729; 5.710.000; 5.631.734; 5.599.695; 5.593.839; 5.578.832; 5.556.752; 5.770.722; 5.770.456; 5.753.788; 5.688.648; 5.753.439; 5.744.306. La Patente de Estados Unidos n.º 5.807.522 (de Brown et al.) divulga un método para controlar cambios tempranos en una célula que se correlacionan con niveles de una patología o terapia y que preceden a cambios detectables en la función o actividad de proteína reales.

Además, pueden sondarse micromatrices de ADN genómico de células madre de tumor sólido para polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), para localizar los sitios de mutaciones genéticas que hacen que las células sean

precancerosas o tumorigénicas. Hay disponible orientación para dichos métodos a través de vendedores comerciales descritos anteriormente y puede encontrarse en libros de métodos genéticos generales, tales como aquellos descritos en el presente documento.

- 5 *Vacunas.* Las células madre de tumor sólido descritas en el presente documento pueden usarse para provocar anticuerpos anti-célula cancerosa. En una realización, el método implica obtener una población enriquecida de células madre de tumor sólido o células madre de tumor sólido aisladas; tratar a la población para evitar la replicación celular (por ejemplo, mediante irradiación); y administrar la célula tratada a un ser humano o sujeto animal en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria a células madre tumorales. Para una orientación acerca de una dosis eficaz de células para su inyección o administración oral véanse, las Patentes de Estados Unidos n.º 6.218.166, 6.207.147, y 6.156.305. En otra realización, el método implica obtener una población enriquecida de células madre de tumor sólido o células madre de tumor sólido aisladas; mezclar las células tumorales en un cultivo *in vitro* con células efectoras inmunitarias (de acuerdo con métodos inmunológicos conocidos en la técnica) a partir de un sujeto humano o animal hospedador en el que se va a producir el anticuerpo; retirar las células efectoras inmunitarias del cultivo; y trasplantar las células inmunitarias efectoras a un animal hospedador en una dosis que sea eficaz para estimular una respuesta inmunológica en el animal.

- 20 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales para células madre de tumor sólido usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Estos incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de linfocitos B, y la técnica de hibridoma de EBV (véase, por ejemplo, Kozbor, D. et al., J. Immunol. Methods 81:31-42 (1985); Cote RJ et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030 (1983), y Cole SP et al. Mol. Cell Biol. 62:109-120 (1984)).

- 25 Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", tales como el corte y empalme de genes de anticuerpo de ratón con genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica adecuadas (véase, por ejemplo, Morrison SL et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984). Neuberger MS et al. Nature 312:604-608 (1984); y Takeda S et al. Nature 314:452-454 (1985)).

- 30 Pueden usarse diversos inmunoensayos para exploración para identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. Se conocen bien en la técnica numerosos protocolos para la unión competitiva o ensayos inmunoradiométrica bien usando anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas.

- 35 El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humanizado. La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de anticuerpo en las que la secuencia de aminoácido en las regiones no de unión a antígeno se ha alterado de tal forma que el anticuerpo se asemeja más estrechamente a un anticuerpo humano, y aún mantiene su capacidad de unión original. Los anticuerpos se humanizan de tal forma que son menos inmunogénicos y por lo tanto persisten durante más tiempo cuando se administran terapéuticamente a un paciente.

- 40 Los anticuerpos humanos pueden generarse usando la tecnología XenoMouse™ de Abgenix (Freemont, Calif, EE.UU.), que permite la generación y selección de productos de anticuerpo de alta afinidad completamente humanos para esencialmente cualquier diana de enfermedad adecuada para terapia de anticuerpos. Véase, las Patentes de Estados Unidos n.º 6.235.883, 6.207.418, 6.162.963, 6.150.584, 6.130.364, 6.114.598, 6.091.001, 6.075.181, 5.998.209, 5.985.615, 5.939.598, y 5.916.771; Yang X et al., Crit Rev Oncol Hemato 38(1): 17-23 (2001); Chadd HE y Chamow SM. Curr Opin Biotechnol 12(2):188-94 (2001); Green LL, Journal of Immunological Methods 231 11-23 (1999); Yang X-D et al., Cancer Research 59(6): 1236-1243 (1999); y Jakobovits A, Advanced Drug Delivery Reviews 31: 33-42 (1998). Los anticuerpos con secuencias de proteínas completamente humanas se general usando razas de ratones modificadas por ingeniería genética en las que la expresión génica de anticuerpos de ratón se suprime y se reemplaza la funcionalidad con la expresión génica de anticuerpos humanos, a la vez que se deja intacto el resto del sistema inmunitario del ratón.

- 55 Además, puede usarse la generación de anticuerpos dirigidos contra marcadores presentes en o sobre las células madre de tumores sólidos descritas en el presente documento como método para identificar dianas para el desarrollo de fármacos. Los anticuerpos que se generan en una respuesta inmunitaria a las células madre de tumor sólido pueden usarse para identificar proteínas antigénicas en las células madre de tumor sólido usando métodos conocidos en la técnica (Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999)) y pueden usarse además para identificar polinucleótidos que codifican dichas proteínas (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., (Wiley Interscience, Nueva York, 1993)). Una vez identificados, las proteínas y polinucleótidos pueden compararse con otras proteínas y polinucleótidos identificados previamente como implicadas con el cáncer. En una realización, puede usarse la tecnología XenoMouse™ para producir anticuerpos completamente humanos para generar anticuerpos dirigidos contra dianas para el desarrollo de fármacos (véase Jeffrey Krasner, Boston Globe (25 de julio de 2001) en F4). La presente invención proporciona una mejora para estos métodos basados en anticuerpos de descubrimiento de fármacos proporcionando las células madre de tumor sólido tumorigénicas, para las que se provoca la respuesta inmunitaria,

para un programa de descubrimiento de fármacos más preciso.

La Microarray Network. Además de las librerías de ADNc y las tecnologías de matriz de ADN descritas anteriormente para estudiar sistemáticamente los patrones de expresión génica, un experto en la técnica de la biología molecular puede obtener orientación para el uso de la tecnología de micromatrices a través de la University of Michigan Microarray Network (véase también el EJEMPLO 9). Además, la Universidad de Michigan se ha comprometido con la bioinformática proporcionando fondos específicos para el manejo y análisis de datos de micromatrices, así como fundando un nuevo centro de bioinformática para la universidad.

Como alternativa, los métodos para provocar una respuesta inmunitaria pueden beneficiarse de las cualidades de "célula madre" de la célula madre de tumor sólido descrita en el presente documento. Las células madre de tumor sólido, los extractos proteicos de células madre de tumor sólido, las proteínas purificadas a partir de las células madre de tumor sólido, o las proteínas procedentes de la expresión de ADNc de células madre de tumor sólido (véase lo anterior para la modificación genética de células madre de tumor sólido) inducen una respuesta inmunitaria en un animal. La respuesta inmunitaria puede dirigirse contra células cancerosas, tal como se muestra en los métodos inmunológicos convencionales. Por ejemplo, las células madre de tumor sólido (poblaciones enriquecidas de células aisladas) o las proteínas pueden ponerse en contacto con células dendríticas en cultivo, con células presentadoras de antígenos en cultivo, o con células presentadoras de antígeno y células T en cultivo. Después las células estimuladas con antígeno se vuelven a infundir en el paciente.

Como alternativa, las células madre de tumor sólido descritas en el presente documento pueden modificarse por ingeniería genética para promover una respuesta inmunitaria contra las células madre tumorales. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética células madre hematopoyéticas para que contengan un receptor de células T que se dirija a un antígeno de célula madre tumoral. Véase, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.914.108 y 5.928.638. Por lo tanto, puede identificarse los receptores de células T que reconocen antígenos expresados por células madre tumorales, y después clonarse en células madre hematopoyéticas. Entonces pueden trasplantarse las células madre hematopoyéticas modificadas por ingeniería genética a un paciente y dejar que se injerten, dando lugar a grandes números de células T que expresan receptores que reconocen a las células madre tumorales. Al aumentar los números de células T específicas de células madre puede potenciarse la respuesta inmunitaria antitumoral.

También hay disponibles otros medios para aumentar al respuesta inmunitaria antitumoral, incluyendo el uso de células madre de tumor como base para una vacuna, el uso de células madre tumorales para estimular a células dendríticas presentadoras de antígeno, y el uso de células madre tumorales como inóculo para generar anticuerpos anti-tumorales. Las células madre de tumor pueden usarse como vacuna eliminando las células madre tumorales de un paciente, tal como mediante irradiación, y volviendo a administrar las células muertas de nuevo al paciente en un portador fisiológica e inmunológicamente aceptable, con el fin de generar una respuesta inmunitaria contra las células madre tumorales. Véase, la patente de Estados Unidos N° 4.960.716, en la que se provocaron anticuerpos para preparaciones de vesículas de membrana de células de carcinoma de mama; la patente de Estados Unidos N° 4.584.268, en la que se produjo un anticuerpo anti-epitelio mamario humano que produjo una fracción de membrana de glóbulos grasos de leche humana deslipidada.

Las células dendríticas de un paciente pueden cultivarse *in vitro* y pueden añadirse células madre muertas del mismo paciente a los cultivos para estimular a las células dendríticas. Las células dendríticas activadas, presentadoras de antígenos de células madre tumorales, pueden volver a administrarse entonces al paciente para estimular la respuesta antitumoral del paciente. Finalmente, pueden administrarse células madre tumorales a un animal, tal como un ratón, rata, hámster, cabra, oveja, conejo, o burro para generar anticuerpos contra las células madre tumorales. Preferentemente, los anticuerpos monoclonales anti-célula madre tumoral se producen en ratones, ratas, o hámsteres. Los anticuerpos monoclonales que se producen de este modo pueden administrarse entonces a pacientes, o humanizarse en primer lugar (tal como se describe anteriormente) y después administrarse a pacientes para promover una respuesta inmunitaria contra las células madre tumorales en el paciente.

Además, se ha demostrado que los vectores adenovirales son especialmente útiles para transferir genes en células eucariotas para el desarrollo de vacunas; Graham FL y Prevec L, en *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, Ellis RV ed., 363-390 (Butterworth-Heinemann, Boston, 1992).

Sonda para escanear micromatrices. La secuenciación completa del genoma humano hace posible la identificación de los genes expresados por una población de células particular. Pueden producirse sondas a partir de poblaciones enriquecidas de células madre tumorales usando métodos conocidos en la técnica (véase Wang et al., *Nature Biotechnology* 18: 457 (2000)). Pueden efectuarse análisis de patrones de expresión génica y patrones de expresión de proteínas para células madre tumorales y poblaciones descendientes de células tumorales comparando los resultados con bases de datos de patrones génicos conocidas o con bases de datos de patrones de proteínas conocidas (por ejemplo, PROSITE, PRINTS: Protein Motif Fingerprint Database, BLOCKS, PFAM, DOMO, PRODOM, u otras bases de datos). Pueden efectuarse búsquedas, por ejemplo, usando el BCM Search Launcher: General Protein Sequence/Pattern Searches (Baylor College of Medicine, Human Genome Sequencing Center, One Baylor Plaza, Houston, TX). También hay disponibles programas comercialmente disponibles para análisis génico y

de proteínas (tales como CGC (de Genetics Computer Group, Inc.) y DNA STRIDER).

Los factores implicados en la proliferación, diferenciación, o supervivencia de células madre tumorales y descendencia de células madre tumorales, o sus respuestas a agentes biológicos pueden aislarse bien construyendo ADNc para librerías o para sondear micromatrices para células madre tumorales, o células de cáncer no tumorigénicas de célula madre tumoral, o células tumorales normales usando técnicas conocidas en la técnica. También puede producirse ADNc a partir de cualquiera de las diferentes poblaciones tras la exposición a agentes biológicos o fármacos para determinar la respuesta a dichas manipulaciones. Las librerías a partir de células de una población se comparan con aquellas de células de diferentes poblaciones para determinar la secuencia de la expresión génica durante el desarrollo y para revelar los efectos de diversos agentes biológicos o para revelar nuevos agentes biológicos que alteran la expresión génica en células cancerosas. Cuando se preparan las bibliotecas a partir de tejido neoplásico, pueden identificarse factores genéticos que desempeñan un papel en la causa del crecimiento de la célula cancerosa, por ejemplo, comparando las bibliotecas de tejido canceroso con aquellas de tejido normal. Esta información puede usarse en el diseño de terapias anti-cáncer. Adicionalmente, pueden identificarse sondas para su uso en el diagnóstico de diversos cánceres o para usarlas en la identificación de células en un estadio particular en el desarrollo tumoral.

Evaluación diagnóstica y pronóstica de tumores. Puede emplearse diversos métodos para la evaluación diagnóstica y pronóstica de tumores y metástasis, y para la identificación de sujetos que tienen una predisposición para dichas afecciones. Entre los métodos bien conocidos en la técnica se encuentran los escáneres óseos, la obtención de imágenes por rayos X, las pruebas de MRI, los escáneres TAC, y análisis de sangre para antígenos asociados a tumores (véase American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 1999; Selected Cancers (1999); American Cancer Society, Breast Cancer Guidelines and Statistics (1999); Kopans Breast Imaging. 2ª Edición (JB Lippincott, Filadelfia, Pensilvania, 1998); Potter y Partin, NCCN Practice Guidelines for Early Detection of Prostate Cancer 13(11A) Oncology (Noviembre de 1999). Para métodos de detección adicionales véase Franklin et al., Breast Cancer Research & Treatment 41(1): 1-13 (1996); Kufe et al., Cancer Research 43(2): 851-7 (1983). Para los escáneres óseos, puede usarse la obtención de imágenes por medicina nuclear. Puede usarse medicina nuclear además de mamografías para ayudar a identificar determinadas anomalías. La medicina nuclear también es una buena herramienta para evaluar la metástasis del cáncer en el sistema linfático, en otros órganos y el sistema esquelético. Los antígenos asociados a tumores incluyen, por ejemplo, BCA 225 (Patente de Estados Unidos n.º 5.681.860); Antígeno asociado a tumor de vejiga (prueba de estado de BTA, ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT); antígeno CA125 asociado a tumores (Wagner et al., Hybridoma 16(1): 33-40 (1997)); 22-1-1 Ag, YH 206, GA 733, CA 125, antígeno carcinoembrionario, y sialil Le^x (Sonoda et al., Cancer 77(8): 1501-1509 (1996)). Para el pronóstico del cáncer de mama, pueden buscarse células cancerosas en la médula ósea del paciente. Véase, por ejemplo, Bruan et al., New Engl. J. Med. (24 de febrero de 2000)).

Dichos métodos pueden, por ejemplo, utilizar reactivos tales como secuencias de nucleótidos de VEGF y anticuerpos para VEGF. Específicamente, dichos reactivos pueden usarse, por ejemplo, para: (1) la detección de la presencia o sobreexpresión de ARNm de VEGF en relación al estado del tejido no carcinogénico; (2) la detección de una sobreabundancia de proteína de VEGF en relación al estado de tejido no carcinogénico; (3) la detección de condiciones hipóxicas en la masa tumoral; (4) la detección de la expresión de receptores de tirosina cinasa de VEGF y otros receptores angiogénicos en los tejidos endoteliales adyacentes; y (5) la detección de la expresión de oncogenes. Los métodos pueden efectuarse, por ejemplo, utilizando kits diagnósticos preempaquetados que comprenden al menos una secuencia nucleotídica específica de VEGF o un reactivo de anticuerpo de VEGF descrito en el presente documento, que puede usarse de manera conveniente, por ejemplo, en situaciones clínicas, para diagnosticar a pacientes en riesgo de angiogénesis y metástasis tumoral.

Además, puede evaluarse la expresión de diferentes alelos de oncogenes usando estos métodos. La información adicional obtenida en referencia a la expresión de otros marcadores proporciona orientación para el diseño de terapias adecuadas para inhibir la angiogénesis o la proliferación a la medida del estado molecular del cáncer en un paciente particular.

Desarrollo de fármacos. En el presente documento se divulga un método para identificar un compuesto de ensayo para reducir tumores sólidos. La práctica del método puede determinarse además usando la orientación proporcionada en los EJEMPLOS a continuación. Las etapas del método incluyen ensayar la respuesta de células tumorales a un agente biológico y determinar los efectos del agente biológico en la célula madre tumoral. En otras palabras, la invención proporciona métodos mejorados para el desarrollo de fármacos mediante el uso de las células madre de tumor sólido de la invención.

La prueba de principios del uso de la invención para el desarrollo de fármacos se proporciona en el desarrollo de fármacos en el EJEMPLO 11 y en la FIG. 11, donde se identificaron marcadores del receptor factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) y de HER2/neu (que se sabe que están implicados en cánceres) en células madre de tumor sólido. Por consiguiente, las terapias dirigidas contra los marcadores de EGF-R (por ejemplo, Yang X et al., Crit Rev Oncol Hematol. 38(1): 17-23 (2001)) y HER2/neu (véase Breast Disease, Vol. 11, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy, Y. Yarden, ed. (IOS Press, Amsterdam, 2000)) pueden dirigirse de manera eficaz a células madre de tumor sólido.

La identificación de rutas biológicas es una parte importante del proceso de desarrollo de fármacos modernos. Las rutas biológicas en células madre de tumor sólido y otras poblaciones celulares obtenidas a partir de tumores sólidos, particularmente las rutas implicadas en las acciones farmacológicas, es decir, las rutas que dan origen a una diana farmacológica (por ejemplo, proteínas), pueden identificarse para su uso tal como se muestra por la Patente de Estados Unidos n.º 5.965.352.

En una serie de métodos, se exploran fármacos para determinar la unión de los compuestos de ensayo a receptores, en los que la unión activa una ruta biológica de un paciente para provocar la expresión de polipéptidos indicadores. Con frecuencia, los polipéptidos indicadores se codifican en polipéptidos recombinantes, en las que el polinucleótido codificante está en unión operativa con un promotor.

Las expresiones "asociado operativamente" o "unido operativamente", tal como se usan en el presente documento, se refieren a polinucleótidos funcionalmente relacionados. Un promotor se asocia de manera operativamente o se une operativamente a una secuencia codificante si el promotor controla la traducción del polipéptido codificado. Aunque las secuencias de ácido nucleico asociadas de manera operativa o unidas de manera operativa pueden ser contiguas y estar en la misma fase de lectura, determinados elementos genéticos, por ejemplo, genes represores, no están unidos de manera contigua a la secuencia que codifica al polipéptido pero aún se unen a secuencias operadoras que controlan la expresión del polipéptido.

La señal detectable puede ser fluorescencia, absorbancia o luminiscencia, dependiendo del polipéptido indicador, que puede ser, por ejemplo, luciferasa (luciferasa de luciérnaga, luciferasa de *Vibrio fischeri*, o luciferasa de *Xenorhabdus luminescens*), proteína fluorescente verde, variante de proteína fluorescente verde, cloranfenicol acetiltransferasa, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, neomicina fosfotransferasa, guanina xantina fosforibosiltransferasa, timidina cinasa, β -lactamasa, fosfatasa alcalina, invertasa, amilasa (para ensayos basados en levaduras), hormona de crecimiento humana (para ensayos basados en actividad). La señal detectable fluorescente puede ser transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), fluorescencia resuelta en tiempo (TRF) o polarización de fluorescencia (FP). Cuando sea adecuado, la señal detectable se detecta por una máquina, tal como un fluorómetro, luminómetro, lector de microplacas de fluorescencia, espectrofluorómetro de microplacas de monocromador dual, espectrofotómetro, microscopio confocal (de barrido láser), o un dispositivo acoplado a carga (CCD). La señal detectable se determina comparando la cantidad de señal producida cuando el polipéptido indicador se expresa en la célula madre tumoral con la señal producida cuando el polipéptido indicador no se expresa en la célula madre tumoral.

Otra técnica para exploración de fármacos proporciona una exploración de alto rendimiento de los compuestos (véase, por ejemplo, la solicitud PCT WO 84/03564). En este método, se sintetizan grandes cantidades de diferentes compuestos de ensayo pequeños sobre un sustrato sólido, tales como puntas de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo se hacen reaccionar con células madre de tumor sólido, o porciones de las mismas, y se lavan. Las células madre tumorales unidas a sólido se detectan entonces mediante métodos bien conocidos en la técnica, usando maquinaria y métodos comercialmente disponibles, por ejemplo, la plataforma informática Automated Assay Optimization (AAO) (Beckman, EE.UU.) que actúa como interfaz con manipuladores de líquidos para permitir el análisis estadístico directo que optimiza los ensayos; sistemas modulares de CRS Robotics Corp. (Burlington, Ontario), sistemas de manejo de líquidos, lectores, e incubadores de diversas compañías que usan POLARA™ (CRS), un programa informático de automatización de laboratorios de arquitectura abierta para un sistema Ultra High Throughput Screening; tecnología 3P (Plug&Play Peripherals), que está diseñado para permitir al usuario reconfigurar la plataforma de automatización enchufando nuevos instrumentos (ROBOCON, Viena, Austria); el sistema Allegro™ o la estación de trabajo Staccato™ (Zymark), que permite una gran variedad de aplicaciones de desarrollo, incluyendo HTS, ultra HTS, y preparación de placas de alta velocidad; el programa informático MICROLAB Vector (Hamilton Co., Reno, Nev., EE.UU.) para la programación e integración de automatización de laboratorios; y otros.

Para cualquiera de estas máquinas y métodos, los ensayos miden una respuesta en las células diana (células madre de tumor sólido o células madre de tumor sólido modificadas por ingeniería genética) que proporcionan evidencias detectables de que el compuesto de ensayo puede ser eficaz. La señal detectable se compara con células de control y la señal detectable identificada mediante análisis de sustracción. La abundancia relativa de las diferencias entre las alícuotas "diana" y "no diana" se comparan simultáneamente usando una técnica de análisis de "sustracción" (análisis diferencial) tal como presentación diferencial, análisis de representación diferencial (RDA), micromatrices de expresión génica, GEM (Patente de Estados Unidos n.º 5.545.531), hibridación de sustracción supresora (SSH) y secuenciación directa (Solicitud de Patente PCT WO 96/17957). El análisis de sustracción puede incluir los métodos de presentación diferencial, de análisis de representación diferencial (RDA), de hibridación de sustracción supresora (SSH), de análisis en serie de expresión génica (SAGE), de micromatriz de expresión génica (GEM), de tecnología de microplaca de ácido nucleico, o de secuenciación directa.

La célula madre de tumor sólido descrita en el presente documento es particularmente útil en el proceso de desarrollo de fármacos debido a que las células madre de tumor sólido proporcionan un conjunto limitado y enriquecido de dianas para el desarrollo de fármacos. Una de las etapas más importantes en el diseño racional de fármacos es la identificación de una diana, la molécula con la que interactúa el fármaco en sí. Con frecuencia, la

diana será un receptor sobre o en una célula madre de tumor sólido tumorigénica.

Del mismo modo, la célula madre de tumor sólido modificada por ingeniería genética descrita en el presente documento es particularmente útil en el desarrollo de fármacos. Por ejemplo, la célula madre modificada por ingeniería genética puede contener polinucleótidos con un promotor unido operativamente al polinucleótido que codifica un polipéptido indicador. El polipéptido indicador se expresa en la célula madre tumoral después de que un receptor de la célula madre tumoral se active mediante la unión a un compuesto de ensayo o se inactive mediante la unión a un compuesto de ensayo. Dicha señal detectable hace que la célula madre de tumor sólido modificada genéticamente sea adecuada para su uso en exploración de alto rendimiento (HTS).

La señal detectable puede ser un resultado de una selección positiva o una selección negativa. La selección positiva incluye manipulaciones que prueban la capacidad de las células para sobrevivir en condiciones de cultivo específicas, la capacidad para expresar un factor específico, los cambios en la estructura celular, o la expresión génica diferencial. La selección puede basarse en la capacidad de las células madre de tumor sólido o de las células madre de tumor sólido modificadas genéticamente para:

- (a) Crecer o sobrevivir en condiciones de cultivo específicas, tales como cultivo celular *in vitro*.
- (b) Expresar un factor específico que pueda medirse, siendo la medida adaptable para una selección. Este factor puede ser cualquier cosa que sea accesible para su medida, incluyendo, pero sin limitación, moléculas secretadas, moléculas de la superficie celular, moléculas solubles e insolubles, actividades de unión, actividades que inducen actividades en otras células o inducen otras reacciones químicas orgánicas o inorgánicas.
- (c) Cambios en la estructura celular, incluyendo cambios morfológicos que se miden mediante métodos físicos, tales como sedimentación diferencial, dispersión de luz diferencial, densidad de floración diferencial, volumen celular diferencial seleccionado mediante tamizado.
- (d) Diferencias en la expresión génica que pueden medirse directamente, incluyendo cambios en marcadores de la superficie celular, cambios en actividades bioquímicas, cualquier cambio que pueda reelegirse en cambios en la unión de sondas marcadas fluorescentemente que pueden usarse en conjunción con un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) o cualquier propiedad que pueda usarse como base para una selección. Las células madre de tumor sólido modificadas genéticamente que contienen polinucleótidos que expresan polipéptidos indicadores son particularmente útiles en este caso.
- (e) Diferencias en la expresión génica que pueden medirse indirectamente, incluyendo cambios en la actividad de factores de transcripción que se miden mediante una construcción génica sintética que codifica un marcador de selección (tal como un marcador de resistencia a fármacos o un marcador de la superficie celular que puede usarse en una selección FACS). Esta categoría también podría incluir cambios en la estabilidad del ARNm, localización del ARNm, el control de la traducción del ARNm. Todos estos cambios podrían ser la base de una selección porque puede construirse una construcción sintética que se controla mediante uno de estos eventos reguladores que podrían dirigir la expresión de un producto génico que se selecciona fácilmente.

Farmacogenómica. Un método mejorado para determinar la propensión a la neoplasia puede comprender el control del progreso de la quimioterapia u otra terapia anticáncer, el control de la reaparición del cáncer, u otra detección similar de un cáncer presente o potencial, donde dicho método detecta la expresión de al menos un gen que está sobre- o infraexpresado en una célula cancerosa potencial, en comparación bien con una célula madre de tumor sólido aislada del paciente o una colección de células madre de tumor sólido. En una realización, el método es el ensayo de una muestra biológica (tal como del paciente) para ensayarla respecto de una señal que indica la transcripción de un transcrito polinucleotídico (por comparación con la célula madre de tumor sólido). Además, se contemplan ensayos de exploración de muestras biológicas, donde dichos ensayos se llevan a cabo solo durante el transcurso de la quimioterapia, o después de intervenciones quirúrgicas para tratar el cáncer, para controlar la presencia continua o el retorno de las células cancerosas.

Un artículo de fabricación (un sistema o un kit) puede comprender material de envasado y un reactivo primario contenido en dicho material de envasado. El reactivo primario es una preparación de células madre de tumor sólido, tal como se describe anteriormente. El material de envasado incluye una etiqueta que indica que el reactivo primario puede usarse para identificar un agente para reducir tumores sólidos.

También se describe un kit para determinar el nivel de actividad de un polinucleótido o proteína particular en una célula. Dichos kits contienen matrices o micromatrices que contienen una fase sólida, por ejemplo, una superficie, a la que se unen, de forma directa o indirecta, las células madre de tumor sólido (poblaciones enriquecidas o aisladas), polinucleótidos extraídos de dichas células madre de tumor sólido, o proteínas extraídas a partir de dichas células madre de tumor sólido. El kit también puede contener sondas que se hibridan o unen a los componentes de la célula madre de tumor sólido en una ubicación conocida de la fase sólida. Estas sondas consisten en ácidos nucleicos de secuencia diferente conocida, siendo cada ácido nucleico capaz de hibridar a una especie de ARN o a una especie de ADNc derivado de este. En particular, las sondas contenidas en los kits descritos en el presente documento son ácidos nucleicos capaces de hibridar específicamente a secuencias de ácido nucleico procedentes de especies de ARN que se sabe que aumentan o disminuyen en respuesta a perturbaciones correlacionadas con las enfermedades o terapias particulares que se van a controlar con el kit. Las sondas contenidas en los kits de la invención excluyen preferentemente de manera sustancial ácidos nucleicos que hibridan con especies de ARN que no están aumentadas o disminuidas en respuesta a perturbaciones correlacionadas con los niveles particulares de patologías

o efectos terapéuticos que van a determinarse con el kit.

Los siguientes EJEMPLOS se presentan para ilustrar mejor las realizaciones preferidas de la invención. Estos EJEMPLOS no deben entenderse de modo alguno como limitantes del alcance de la invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA

El fin de este EJEMPLO es mostrar la caracterización estructural y funcional celular de las células madre de cáncer de mama.

Se ha desarrollado tanto un cultivo tisular como un modelo de ratón para identificar a la célula clonogénica de cáncer de mama. En el modelo de ratón, se trata a ratones NOD/SCID, Lapidot et al., Nature 367(6464): 645-8 (1994) con VP-16 (Etopósido) (disponible de fuentes comerciales, tales como Moravek Biochemicals, Brea, CA, EE.UU.), y se implantan con tejido primario de cáncer de mama humano (obtenido de especímenes de mastectomía o lumpectomía). Se formaron tres de cinco tumores primarios en este sistema.

Las células tumorales aisladas a partir de efusiones pleurales malignas obtenidas de dos pacientes (véase Zhang et al., Invasion & Metastasis 11(4): 204-15 (1991)) se suspendieron en Matrigel™ (disponible a través de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), después se inyectaron en ratones. Se formaron tumores en los ratones inyectados.

Mediante este método, se pudieron generar suficientes células tumorales para su análisis por FACS. También se pudo generar suficientes células tumorales para efectuar ensayos biológicos para caracterizar las células. (Para el ensayo clonogénico para detectar células tumorales raras en muestras hematopoyéticas, véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.674.694).

Pueden aislarse subconjuntos fenotípicamente distintos de células tumorales mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica, incluyendo FACS usando un reactivo de unión conjugado a marcador de fluorocromo. Cualquier otro método adecuado que incluya el acoplamiento y el desacoplamiento de la fase sólida también se encuentra dentro del alcance de la invención. Los procedimientos para la separación pueden incluir separación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad y paneo con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, una placa, u otra técnica conveniente. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen clasificadores celulares activados por fluorescencia, que tienen diversos grados de sofisticación, tales como canales multicolor, canales de detección de ángulo estrecho y de dispersión obtusa de la luz, canales de impedancia, etc. Las células muertas pueden eliminarse mediante selección con colorantes que se unen a células muertas (tales como yoduro de propidio (PI), o 7-AAD). Puede emplearse cualquier técnica que no sea indebidamente perjudicial para la viabilidad de las células seleccionadas.

El reactivo de unión a marcador puede conjugarse directa o indirectamente a un reactivo magnético, tal como una micropartícula superparamagnética (micropartícula). La conjugación directa a una partícula magnética se logra mediante el uso de diversos grupos de acoplamiento químico, tal como se conoce en la técnica. Los anticuerpos pueden acoplarse a las micropartículas a través grupos amino o sulfhidrilo de cadena lateral y reactivos de reticulación heterofuncional. Hay disponible un gran número de compuestos heterofuncionales para unirlos a entidades. Un grupo enlazante preferido es el N-hidroxisuccinimidiléster del ácido 3-(2-piridilditio)propiónico (SPDP) o el N-hidroxisuccinimidiléster del ácido 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxílico (SMCC) con un grupo sulfhidrilo reactivo en el anticuerpo y un grupo amino reactivo en la partícula magnética. Como alternativa, el reactivo de unión a marcador se acopla directamente a partículas magnéticas. El reactivo de unión a marcador se conjuga directamente a un hapteno, y se conjugan anticuerpos secundarios específicos de antígeno a las partículas. Los haptenos adecuados incluyen digoxina, digoxigenina, FITC, dinitrofenilo, nitrofenilo, avidina, biotina, etc. Los métodos para la conjugación del hapteno a una proteína se conocen en la técnica, y los kits para dichas conjugaciones están comercialmente disponibles. Los anticuerpos marcados con fluorocromo son útiles para la separación por FACS, las partículas magnéticas para la selección inmunomagnética, particularmente la selección magnética de alto gradiente (HGMS), etc. Los dispositivos de separación magnética ejemplares se describen en las Solicitudes de Patente PCT WO 20/07380 y WO 96/09550, y en la Patente europea 0 438 520.

Se ha estudiado exhaustivamente los tumores formados por una de las células de tumores primarios y una de las de efusión pleural maligna. Se han identificado condiciones de cultivo tisular bajas en suero en las que las células de cáncer de mama y las células aisladas de un xenoinjerto de ratón proliferan durante al menos 1-3 semanas en cultivo tisular. Usando el modelo de cultivo tisular *in vitro*, se descubrió que la estimulación de un receptor específico puede afectar al crecimiento y supervivencia de células de cáncer de mama.

Se han usado los modelos *in vitro* (cultivo tisular) e *in vivo* (xenoinjerto de ratón) de cáncer de mama humano. Se recogió un tumor humano que crecía en el modelo de ratón y se convirtió en una suspensión de células individuales

y se analizó mediante FACS. Se descubrió una heterogeneidad de expresión de marcadores de la superficie celular en células tumorales. Inicialmente, se separaron células de cáncer de mama aisladas a partir de una efusión pleural maligna en grupos basándose en la expresión de CD44. Las células se analizaron respecto de la expresión de los marcadores 520C9 y CD44 (véase la FIG. 2). Se sabe que 520C9 reconoce a c-erbB-2 (HER-2/neu). Ring et al., Molecular Immunology 28:915 (1991). Véase también, la Patente de Estados Unidos n.º 4.753.894, que divulga anticuerpos monoclonales murinos que se unen de manera selectiva a células de cáncer de mama humano. Cuatro poblaciones de células fueron identificables. Había una pequeña población de células que expresaba ambos marcadores, 520C9 y CD44, una población que expresaba solo uno de los marcadores, así como una población que no expresó ninguno de los marcadores. Las células se aislaron respecto de la expresión de CD44 (FIG. 2). Las células CD44⁺ o CD44⁻ se ensayaron respecto de su capacidad para proliferar. Las células tumorales marcadoras CD44⁺, pero no las células tumorales marcadoras CD44⁻, fueron capaces de formar colonias *in vitro* y tumores *in vivo* (TABLA 1). Nótese que el aislamiento de células CD44⁺ da como resultado una purificación de al menos 2,5 veces de las células tumorigénicas.

TABLA 1 POBLACIONES AISLADAS DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA		
	CD44 ⁺	CD44 ⁻
Colonias <i>in vitro</i>	+	-
Tumorigenicidad en ratones	+	-
Se recogieron células de cáncer de mama humano usando FACS. El análisis de las colonias <i>in vitro</i> se efectuó en 2 pocillos separados usando 5.000 células del fenotipo respectivo. El crecimiento <i>in vivo</i> de las células clasificadas se efectuó inyectando a ratones con 2 x 10 ⁶ células marcadoras CD44 ⁺ o CD44 ⁻ . Los ratones se analizaron a la semana en el experimento 1 y a la semana 4 en el experimento 2. Las inyecciones de células marcadoras CD44 ⁺ , pero no las células marcadoras CD44 ⁻ , dio como resultado la formación y crecimiento de tumores <i>in vitro</i> . Los experimentos <i>in vitro</i> se han replicado usando células congeladas aisladas del paciente y apoyan a los experimentos <i>in vitro</i> . Los experimentos <i>in vivo</i> se han replicado dos veces.		

Estos resultados sirven como prueba de principio del modelo de célula madre de cáncer sólido y demuestran lo siguiente:

- (a) las células de tumor sólido son fenotípica y funcionalmente heterogéneas; algunas células tumorales son tumorigénicas, mientras que otras tienen un potencial proliferativo limitado y no forman tumores tras su trasplante;
- (b) al separar las células mediante FACS, se puede enriquecer respecto de células tumorigénicas; y
- (c) al estudiar las fracciones tumorigénicas se pueden aislar células madre tumorales y enfocar de manera más cuidadosa las estrategias para identificar dianas terapéuticas.

Este EJEMPLO demuestra que la célula tumoral de cáncer de mama clonogénica de dos tumores expresa CD44. Otros marcadores también permiten la purificación adicional de la célula madre de cáncer de mama. Se han analizado las células tumorales respecto de la expresión de varios antígenos. Algunos antígenos con patrones de expresión heterogéneos incluyen MUC1, Notch-4, anexina V, 317G5, CD9, CD24, 260F9, P-glucoproteína y CD49F. 260F9 se une a un antígeno de superficie de glucoproteína de 55 kilodalton (mucina) de células B. Weiner LM et al., Cancer Res. 49:4062-4067 (1989). Gregg, EO. et al J. Immunol, 138:4502-4508 (1987). Véase también, Patente de Estados Unidos n.º 4.753.894, que divulga anticuerpos monoclonales murinos que se unen de manera selectiva a células de cáncer de mama humano. Las combinaciones de estos marcadores con CD44 permiten el enriquecimiento aumentado de las células madre de tumor sólido más allá de lo que se lograba solo con CD44.

De manera destacable, todas las células CD44⁺ (tumorigénicas) también son B38.1⁺. Véase, Kufe et al., Cancer Research 43(2): 851-7 (1983) para la descripción del anticuerpo para B38.1. La expresión de anexina, Notch-4, y CD24 es heterogénea en las células B38.1⁺. Por lo tanto se pudieron purificar adicionalmente las células madre de cáncer de mama de dos tumores analizando diversas poblaciones de células B38.1⁺ o CD44⁺. De hecho, se han aislado células B38.1⁺CD24⁺, y B38.1⁺CD24⁻ obtenidas de una biopsia primaria y se pusieron en cultivo tisular. Solo las células B38.1⁺CD24⁻ formaron colonias. En otro tumor, se aislaron las poblaciones de células 260F9⁺CD24⁻, 260F9⁺CD24^{hi}, y 260F9⁺CD24^{lo}. Solo la población de células CD24^{-/lo} formó tumores (TABLA 2). Nótese que hay un enriquecimiento de 5-6 veces de células tumorigénicas usando B38.1 o 260F9 y CD24.

TABLA 2 ANÁLISIS DE LA TUMORIGENICIDAD DE CÉLULAS CD24 ⁺ Y CD24 ^{-/lo}		
Formación de tumores	CD24 ⁺	CD24 ^{-/lo}
Tumor T1	-	+
Tumor T2	-	+
Se inyectó a ratones NOD/SCID con 50.000-200.000 células CD24 ⁺ o CD24 ^{-/lo} y se analizaron respecto de la formación de tumores dos semanas después.		

EJEMPLO 2

PAPEL DE NOTCH EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MAMARIAS

El fin de este EJEMPLO es proporcionar pruebas preliminares de que en al menos dos tumores diferentes, Notch 4 se expresa por una minoría de las células tumorigénicas. Se analizaron las células del tumor T1 y del tumor T2 del EJEMPLO 1 respecto de la expresión de Notch 4. Las células se tiñeron con un anticuerpo policlonal anti-Notch 4 y se analizaron mediante FACS. Un 5-15 % de las células expresaron niveles detectables de Notch 4. Además, diferentes poblaciones de células no tumorigénicas expresan diferentes ligandos de Notch y miembros de la familia de Frinze. Para determinar qué ARN de Notch se expresan por el tejido mamario normal y por el tejido tumoral mamario, se llevó a cabo RT-PCR usando cebadores específicos para cada ARNm de Notch. Interesantemente, Notch 1, Notch 3 y Notch 4, pero no Notch 2, se expresaron tanto por células mamarias normales y células tumorales mamarias. Se preparó ARN a partir de 100.000 células. La RT-PCR de células mamarias normales o células de tumores mamarios se llevó a cabo usando cebadores específicos para Notch 1, Notch 2, Notch 3, y Notch 4. Estaba presente un producto de PCR del tamaño predicho para Notch 1, 3, y 4, mostrando la presencia de estos marcadores en estas células. La señal se perdió si el ARN se pretrató con RNasa.

Para determinar el papel de Notch en la proliferación, se añadieron al medio un ligando de Notch recombinante o péptidos agonistas del ligando en cultivos de células epiteliales mamarias normales. Ambos agonistas de Notch estimularon la supervivencia/proliferación de células individuales: en presencia de los agonistas de Notch, se formaron 2-3 veces más colonias e incluyeron un mayor porcentaje de colonias grandes mixtas (40 % frente al 20 %). Cuando se plantaron células individuales a densidad clonal, se obtuvieron dos tipos de colonias. Hubo grandes colonias compuestas de cientos de miles de células, que surgían presumiblemente a partir de células madre de tumor sólido, que fueron de una mezcla de células mioepiteliales y de células epiteliales ductales. También hubo colonias más pequeñas de células que parecían contener solo un linaje individual y que probablemente representó a la descendencia de progenitores restringidos.

A partir de una célula epitelial de mama normal cultivada *in vitro*, se generaron colonias de dos linajes (que contenían células tanto mioepiteliales como epiteliales ductales) a partir de células individuales. Las células mioepiteliales se identificaron mediante tinción con un anticuerpo anti-CALLA. Las células epiteliales ductales se identificaron mediante tinción con un anticuerpo anti-ESA. Los organoides crecidos en Matrigel™ en presencia o ausencia del péptido agonista de Notch se ramificaron y proliferaron más en presencia del péptido agonista de Notch. Este péptido agonista también inhibió la diferenciación, según se indicó por la inhibición de la producción de caseína. Estos resultados demuestran que estos ensayos también proporcionan un medio para detectar progenitores multipotentes a partir de epitelio mamario normal. Este ensayo puede usarse para la purificación de células madre mamarias normales. Estos resultados también demuestran que Notch tiene una función en el desarrollo mamario normal.

Entonces se examinó la expresión de Notch 4 en células tumorales de cáncer de mama. Se expresaron altos niveles de Notch 4 en una minoría de las células tumorales. Cuando la población B38.1, que identifica a la población tumorigénica, se analizó respecto de la expresión de Notch 4, se hizo evidente una población menor de células que fueron B38.1^{low}, Notch 4⁺.

Se clasificaron las células Notch 4⁺ y Notch 4⁻ y se las analizó *in vitro*. De manera sorprendente, ninguna de las poblaciones creció en cultivo tisular. Había dos posibles explicaciones. En primer lugar, era posible que la interacción entre las dos poblaciones de células fuese necesaria para el crecimiento celular. A continuación, el anticuerpo puede ser bien un agonista o un antagonista de Notch 4 y puede inhibir el crecimiento de células tumorales. Para distinguir entre estas posibilidades, las células tumorales se incubaron con el anticuerpo anti-Notch 4, y después se ensayaron *in vitro*. Las células de cáncer de mama se pusieron en cultivo tisular después de exponerlas a un anticuerpo anti-Notch 4. Las células se incubaron sobre huelo durante 1 h en HBSS que no contenía anticuerpo anti-Notch 4, que contenía anticuerpo anti-Notch 4, o anticuerpo anti-Notch 4 que se había preincubado con el péptido usado para generar el anticuerpo. También se crecieron las células en presencia de Delta soluble y sin Delta soluble como control.

Aunque las células de control crecieron en cultivo tisular y formaron colonias, las células incubadas con el anticuerpo de Notch 4 no. Cuando se incubó el anticuerpo anti-Notch 4 con el péptido usado para generar el anticuerpo antes de la adición a las células, se restauró el crecimiento. Para confirmar un papel de Notch para el crecimiento *in vitro*, las células se incubaron en condiciones si suero en medio que contenía Delta soluble, un ligando de Notch, o un cultivo de control sin Delta. Los cultivos con Delta formaron muchas colonias, mientras que solo se formaron unas pocas colonias pequeñas sin Delta soluble o en cultivos que usaban células expuestas al anticuerpo anti-Notch 4. Cuando se preincubó el anticuerpo con el péptido, el anticuerpo dejó de bloquear la proliferación. Por lo tanto, la ruta de Notch 4 es crítica para el crecimiento de células de cáncer de mama *in vitro*.

Las células tumorales se expusieron al anticuerpo anti-Notch 4 y después se inyectaron las células en ratones para determinar si el anticuerpo inhibe la formación de tumores. Se incubaron 35.000 células tumorales sin anticuerpo,

con el anticuerpo anti-Notch 4 o el anticuerpo anti-Notch 4 que se había preincubado con el péptido usado para generar el anticuerpo. Después de dos semanas, el diámetro de los tumores formados por las células al anticuerpo anti-Notch 4 fue un 40 % más pequeño que los tumores de control. Por lo tanto, las células que se expusieron al anticuerpo anti-Notch 4 formaron tumores más pequeños que las células que se expusieron al anticuerpo anti-Notch 4 que se incubó con el péptido usado para generar el anticuerpo.

Expresión de Notch, ligandos de Notch, y miembros de la familia de Frnce en subpoblaciones de células tumorales de cáncer de mama. Se examinó la expresión de miembros de la familia de receptores de Notch, de ligandos de Notch y de proteínas que modifican la señal de Notch en poblaciones de células tumorales mamarias. Inicialmente se centró la atención en los marcadores en las poblaciones Notch 4⁺ y Notch 4⁻. Se aislaron cien células Notch 4⁺ o Notch 4⁻ mediante FACS (véase, la FIG. 4). Se efectuaron cuarenta ciclos de PCR para detectar el ARNm indicado. La población Notch 4⁺ expresó Notch 1, Notch 4, y Jagged (un ligando de Notch). La población Notch 4⁻ expresó Notch 1 y Notch 3 así como Jagged. Interesantemente, no se expresó Notch 3 (que puede inhibir la señalización a través de otros receptores de Notch) por la población Notch 4⁺.

Resumen. Se han desarrollado ensayos *in vitro* e *in vivo* para células mamarias humanas normales y células madre de tumor mamario humano. En dos tumores diferentes que surgieron del modelo de ratón NOD/SCID, las células tumorales fueron heterogéneas respecto de la expresión de varios marcadores de la superficie celular. En ambos tumores, el fenotipo de la célula madre tumoral clonogénica fue B38.1⁺CD44⁺CD24^{-lo}. Se observó que la misma población era clonogénica en el ensayo *in vitro*. Esta población B38.1⁺ puede subdividirse adicionalmente usando varios marcadores adicionales. Las pruebas *in vitro* e *in vivo* implican fuertemente a la ruta de Notch, especialmente a Notch 4, desempeñando una ruta central en la tumorigénesis.

EJEMPLO 3

MODELO DE XENOINJERTO DE RATÓN

Se ha desarrollado un modelo de xenoinjerto en el que se ha sido capaz de establecer tumores a partir de tumores mamarios primarios mediante la inyección de los tumores en la glándula mamaria de ratones gravemente inmunodeficientes. Se han establecido xenoinjertos de tumores de especímenes de mastectomía de todos los cinco pacientes que se han ensayado hasta la fecha. También se ha sido capaz de establecer tumores a partir de tres efusiones pleurales malignas. Se trató a ratones NOD/SCID con VP-16, y se implantaron con tejido de cáncer de mama humano primario. Las células tumorales aisladas de tres efusiones pleurales malignas suspendidas en Matrigel® se inyectaron en ratones y también formaron tumores. Esto permitió generar suficientes células tumorales malignas para facilitar el análisis mediante citometría de flujo y ensayo para la capacidad de los distintos subgrupos de células para formar tumores. Se ha estudiado exhaustivamente los tumores formados por una de las células de tumores primarios y una de las de efusión pleural maligna. Además, en los tres tumores en los que se intentó hacer lo mismo, se fue capaz de producir suspensiones de células individuales y de transferir los tumores. Estas mejoras en el ensayo de xenoinjerto han permitido efectuar pruebas biológicas y moleculares para caracterizar a la célula de cáncer de mama clonogénica. Además, se han descubierto condiciones de cultivo tisular en las que las células de cáncer de mama y las células aisladas de un xenoinjerto de ratón han proliferado durante un periodo corto de tiempo (de 1-3 semanas) en cultivo tisular.

Se recogió un tumor humano que crecía en el modelo de ratón, se convirtió en una suspensión de células individuales, y se analizó mediante FACS. Hubo heterogeneidad de expresión de marcadores de la superficie celular por células tumorales. Inicialmente, se separaron células de cáncer de mama aisladas a partir de una efusión pleural maligna en grupos basándose en la expresión de CD44. Las células se analizaron respecto de la expresión de los marcadores 520C9 y CD44. Tres poblaciones de células fueron identificables. Había una pequeña población de células que expresaba ambos marcadores, 520C9 y CD44, una población que expresaba solo uno de los marcadores, así como una población que no expresó ninguno de los marcadores. Las células se aislaron respecto de la expresión de CD44. Las células CD44⁺ o CD44⁻ se ensayaron respecto de su capacidad para proliferar. Las células tumorales marcadoras CD44⁺, pero no las células tumorales marcadoras CD44⁻, fueron capaces de formar colonias *in vitro* y tumores *in vivo* (TABLA 3). Nótese que el aislamiento de células CD44⁺ da como resultado un enriquecimiento de 2 veces de las células tumorigénicas.

TABLA 3
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO RECOGIDAS USANDO FACS

	CD44 ⁺	CD44 ⁻
Colonias <i>in vitro</i>	+	-
Tumorigenicidad en ratones	+	-

El análisis de las colonias *in vitro* se efectuó en 2 pocillos separados usando 5.000 células del fenotipo respectivo. El crecimiento *in vivo* de las células clasificadas se efectuó inyectando a ratones con 2×10^6 células marcadoras CD44⁺ o CD44⁻. Los ratones se analizaron a la semana 3 en la prueba 1 y a la semana 4 en la prueba 2. Las inyecciones de células marcadoras CD44⁺, pero no las células marcadoras CD44⁻, dio como resultado la formación y crecimiento de tumores *in vitro*. Las pruebas *in vitro* se han replicado usando células congeladas aisladas del paciente y apoyan a las pruebas *in vitro*. Las pruebas *in vivo* se han replicado dos veces.

Estos resultados demuestran que la célula de cáncer de mama clonogénica expresa CD44. Se ha comenzado la búsqueda para otros marcadores que puedan permitir purificar adicionalmente las células madre de cáncer de mama. Para hacer esto, se han analizado las células tumorales respecto de la expresión de varios antígenos.

5 De manera sorprendente, todas las células CD44⁺ (tumorigénicas) también fueron B38.1⁺. De hecho, se han aislado células B38.1⁺CD24⁺, y células B38.1⁺CD24⁻ obtenidas de una biopsia primaria y se pusieron en cultivo tisular. Solo las células B38.1⁺CD24⁻ formaron colonias.

10 A continuación se aislaron células de dos de los tumores basándose en la expresión del marcador CD24. En el tumor T2 se aislaron las poblaciones CD24⁻, CD24^{lo} y CD24^{hi}. En ambos casos, solo las poblaciones CD24^{-/lo} formaron tumores (TABLA 4). Nótese que hubo un enriquecimiento de 5-6 veces de células tumorigénicas usando B38.1 y CD24.

TABLA 4 FRACCIONES DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA AISLADAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO		
Formación de tumores en ratón	CD24 ⁺	CD24 ^{-/lo}
Tumor T1	-	+
Tumor T2	-	+
Se inyectó a los ratones con 50.000 células CD24 ⁺ o CD24 ^{-/lo} . La formación de tumores se determinó a las 4 semanas después de la inyección.		

15 *Análisis de tumores que surgen a partir de la población de células CD24⁻*. Mediante el modelo de célula madre de tumor sólido, las células CD24⁻ dan lugar a tumores que contienen células tanto CD24⁺ como CD24⁻. Para probar esta hipótesis, se efectuaron trasplantes secundarios usando células B38.1⁺CD24⁻.

20 Se extirparon los tumores resultantes y se volvieron a analizar las células respecto de la expresión de B38.1 y CD24. Tal como se predijo en el modelo de célula madre, las células obtenidas de un tumor que surgía a partir de células B38.1⁺CD24⁻ trasplantadas fueron heterogéneas con respecto a la expresión tanto de B38.1 como de CD24. El patrón de expresión de marcadores de las células aisladas a partir del tumor iniciado por las células B38.1⁺CD24⁻ fue similar al del tumor original.

25 Estos resultados son una prueba de principio del modelo de célula madre de cáncer de tumor sólido y demuestran lo siguiente:

- 30 (1) las células tumorales son fenotípica y funcionalmente heterogéneas;
 (2) al separar las células mediante FACS, se puede enriquecer respecto de células tumorigénicas; y
 (3) al ensayar las fracciones tumorigénicas, se pueden aislar células madre tumorales y enfocar de manera más cuidadosa las estrategias para identificar dianas terapéuticas.

EJEMPLO 4

35 ANÁLISIS DE CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA PRIMARIO EN UN MODELO DE RATÓN

Se han establecido tumores a partir de ocho pacientes en el presente modelo de ratón. También se caracterizaron tumores establecidos a partir de tres tumores primarios y dos efusiones pleurales. Dos fueron tumores de crecimiento rápido y tres fueron tumores de crecimiento lento.

45 El fenotipo de la célula tumorigénica se determina para cada uno de los diferentes tumores. Para su análisis, el tumor se retiró de los ratones y se convirtió en una suspensión de células individuales. Primero se confirmó el modelo de célula madre de tumor sólido de la invención y que el fenotipo de las células tumorigénicas fuese de hecho B38.1⁺ CD44⁺ CD24^{-/lo}. En todos los tumores, se efectúan análisis de dilución limitante de células aisladas mediante FACS tras la expresión de estos marcadores.

50 Basándose en los datos preliminares, el cóctel de anticuerpo que da lugar a la mayor purificación de células tumorigénicas putativas es el siguiente: anti-38.1-APC anti-CD44-FITC, y anti-CD24-PE, anti-CD3/MoV18, anti-CD2-citocromo, anti-CD10/MoV18, anti-CD14-citocromo, anti-CD16/MoV18, anti-CD31/MoV18, CD45-citocromo, CD140b-citocromo, anti-CD64/MoV18, anti-ESA-Phar-red y 7AAD (un marcador de viabilidad). Todos los anticuerpos

marcados con citocromo se consideran parte de un cóctel de linaje (LINEAGE⁻). Se usó FACS para aislar a la célula madre de cáncer de mama putativa, que en el xenoinjerto de tumor T1 es la población de células CD44⁺CD24⁻LINEAGE⁻, la población de células CD44⁺B38.1⁺CD24⁻LINEAGE⁻ está más enriquecida, y la población de células ESA⁺CD44⁺B38.1⁺CD24⁻LINEAGE⁻ es la más enriquecida para las células madre de cáncer de mama. Las diferentes poblaciones de células malignas se ensayan en los modelos *in vivo* e *in vitro* para confirmar que el fenotipo de la célula tumorigénica primaria no cambia cuando crece en el modelo de xenoinjerto de ratón. A medida que se enriquecen las células tumorigénicas, disminuye número de células y el tiempo necesario para formar un tumor.

10 EJEMPLO 5

PAPEL DE NOTCH EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MAMARIAS

La proteína Notch es un receptor para los factores de crecimiento/supervivencia Delta y Jagged (Panin et al., 1 Nature 387(6636): 908-912 (1997); Perron et al., Cellular & Molecular Life Sciences 57(2): 215-23 (2000); Shimizu et al., Journal of Biological Chemistry 274(46): 32961-9 (1999)). En algunas células madre normales, se sabe que Notch desempeña un papel importante en la proliferación, supervivencia y diferenciación. Apelqvist et al., Nature 400(6747): 877-81 (1999); Berry et al., Development 124(4): 925-36 (1997); Yasutomo et al., Nature 404(6777): 506-10 (2000); Morrison, Cell 101: 499-510 (2000). En determinadas situaciones, la estimulación de Notch puede promover la auto-renovación de células madre mientras que en otras situaciones puede promover la diferenciación. Delta activa a los cuatro receptores de Notch.

Se examinó la expresión de Notch 4 en las células tumorales de cáncer de mama. Notch 4 se expresó en la minoría de células tumorales. Cuando la población B38.1, que identifica a la población tumorigénica, se analizó respecto de la expresión de Notch 4, se hizo evidente una población menor distinta de células que fueron B38.1⁺ y Notch 4⁺.

Se clasificaron las células Notch 4⁺ y Notch 4⁻ y se las analizó respecto de su capacidad para formar colonias *in vitro*. De manera sorprendente, ninguna de las poblaciones creció en cultivo tisular. Había dos posibles explicaciones. En primer lugar, era posible que la interacción entre las dos poblaciones de células fuese necesaria para el crecimiento celular. Como alternativa, el anticuerpo puede ser bien un agonista o un antagonista de Notch 4 y la inhibición o la activación del receptor puede inhibir el crecimiento de células tumorales.

Para distinguir entre estas posibilidades, las células tumorales no separadas se incubaron con el anticuerpo anti-Notch 4, y después se ensayaron respecto de su capacidad para formar colonias *in vitro*. Aunque las células de control crecieron en cultivo tisular y formaron colonias (FIG. 5 A), las células incubadas con el anticuerpo de Notch 4 no crecieron (FIG. 5 B). Cuando se preincubó el anticuerpo anti-Notch 4 con el péptido usado para generar el anticuerpo (este péptido debe en teoría bloquear la unión del anticuerpo a las células), se restauró la capacidad de las células tumorales para formar colonias (FIG. 8C). Para confirmar que Notch regula la formación de colonias por células tumorales, las células se incubaron en medio con o sin Delta soluble (FIG. 5 A y la FIG. 5D, respectivamente). Los cultivos con Delta formaron muchas colonias (FIG. 5 A), mientras que solo se formaron unas pocas colonias pequeñas en medio que carecía de Delta soluble o en cultivos que usaban células expuestas al anticuerpo anti-Notch 4 (FIG. 5 B, La FIG. 5D, y FIG. 5E). En su conjunto, estos resultados demuestran que la ruta de Notch 4 regula la proliferación/supervivencia de las células de cáncer de mama y que el anticuerpo anti-Notch 4 bloquea la activación *in vitro*.

A continuación, las células tumorales se incubaron con el anticuerpo anti-Notch 4 y después se inyectaron las células en ratones para determinar si el anticuerpo inhibe la formación de tumores. Las células que se expusieron al anticuerpo anti-Notch 4 formaron tumores más pequeños que las células que se expusieron al anticuerpo anti-Notch 4 que se incubó con el péptido usado para generar el anticuerpo antes de su adición a las células. Se incubaron aproximadamente 350.000 células tumorales sin anticuerpo, con el anticuerpo anti-Notch 4, o con el anticuerpo anti-Notch 4 que se había incubado con el péptido usado para generar el anticuerpo. Después de dos semanas, el diámetro de los tumores formados por las células al anticuerpo anti-Notch 4 fue un 40 % más pequeño que cualquiera de los tumores de control. La explicación más simple de los ensayos *in vitro* e *in vivo* es que la activación de Notch 4 promueve la proliferación/supervivencia de las células madre y que el anticuerpo anti-Notch 4 bloquea la activación de receptor.

EJEMPLO 6

CARACTERIZACIÓN ADICIONAL DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA

Se han establecido tumores de cáncer de mama humano en ratones NOD/SCID a partir de cinco tumores (especímenes de mastectomía de tres tumores de mama primarios y dos efusiones pleurales malignas de cáncer de mama metastásico). Los cinco tumores se usaron inicialmente para entender la heterogeneidad de los marcadores de células neoplásicas. Basándose en estos resultados, se efectuaron experimentos usando células aisladas de tumores primarios directamente después de su extracción de un paciente para confirmar que el modelo de xenoinjerto de ratón refleja de manera precisa el cáncer de mama humano.

Expresión y tumorigenicidad de CD44. Las células obtenidas del cáncer de mama metastásico, designadas T1, y de un tumor de mama primario, designadas T2, se seleccionaron para su expansión en ratones para obtener suficientes células para su análisis. Para lograr esto, se crecieron 10^6 - 10^7 células de efusión pleural de T1 (una muestra congelada) o un trozo de 1-2 mm³ de T2 (muestra fresca de biopsia) en el panículo adiposo mamario de ratón durante 1 a 3 meses. Entonces se recogieron los tumores humanos resultantes, se convirtieron en suspensiones de células individuales y se analizaron por citometría de flujo para la expresión de varios antígenos diferentes. Las células de ratón contaminantes se eliminaron por clasificación del análisis eliminando las células que expresaban H-2K de ratón (complejo mayor de histocompatibilidad de clase I) y las células muertas se eliminaron usando un colorante de viabilidad.

Tal como se predijo en el modelo de célula madre de tumor sólido, las células mostraron expresión heterogénea de diversos marcadores de superficie, incluyendo CD44 y B38.1. Para determinar si estos marcadores podían distinguir las células tumorigénicas de las no tumorigénicas, se aislaron células CD44⁺ y CD44⁻ (FIG. 6) a partir de estas células T1 o T2 pasadas *in vivo* y se inyectó a ratones NOD/SCID con células CD44⁺ o CD44⁻.

Identificación y otros marcadores informativos. Entre 6 y 12 semanas después de la inyección, se examinó a los ratones respecto de tumores mediante observación y palpación, y después se efectuaron necropsias en todos los ratones para buscar crecimientos en los sitios de inyección que pudieran ser demasiado pequeños como para palparlos. Todas las inyecciones de CD44⁺ dieron lugar a tumores visibles, pero ninguna de las inyecciones de CD44⁻ formó tumores detectables (TABLA 5). A continuación, las células de T1 y T2 del primer pase se clasificaron basándose en la expresión de B38.1 y se inyectaron en ratones. Aparecieron tumores de todas las inyecciones de células B38.1⁺ pero no se detectó formación de tumores de células B38.1⁻ (TABLA 5). Por lo tanto, las células tumorigénicas de ambos tumores pasados fueron B38.1⁺CD44⁺.

TABLA 5			
Tumorigenicidad de diferentes poblaciones de células tumorales de T1 y T2			
Células/inyección	n.º de tumores/n.º de inyecciones		
	8x10 ⁵	5x10 ⁵	2x10 ⁵
Células T1			
CD44 ⁻	0/2	0/2	-
CD44 ⁺	2/2	2/2	-
B38.1 ⁻	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁻	-	-	6/6
Células T2			
CD44 ⁻	0/2	0/2	-
CD44 ⁺	2/2	2/2	-
B38.1 ⁻	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁻	-	-	6/6
Las células se aislaron mediante citometría de flujo tal como se describe en la FIG. 2 basándose en la expresión del marcador indicado y se ensayaron respecto de la capacidad para formar tumores después de la inyección de 2-8 x 10 ⁵ células en el panículo adiposo mamario de ratones NOD/SCID. El número de tumores que se formaron/el número de inyecciones efectuadas se indica para cada población de células.			

Los tumores también fueron heterogéneos respecto de la expresión de CD24. Cuando se inyectaron 200.000 células CD24⁺ o CD24⁻ en ratones NOD/SCID, crecieron tumores en todos los ratones inyectados con células CD24⁻ (TABLA 5). Aunque no pudieron detectarse tumores mediante palpación en las localizaciones inyectadas con células CD24⁺, dos de los doce ratones inyectados con células CD24⁺ contenían pequeños crecimientos en el sitio de inyección que solo se detectaron tras una necropsia abierta. Los sitios inyectados con células CD24⁻, por el contrario, tenían todos tumores mayores de 1 cm de diámetro que fueron rápidamente evidentes visualmente y por palpación. Ya que es extremadamente difícil eliminar por completo las células CD24⁻ de la fracción de CD24⁺ por citometría de flujo, los pequeños crecimientos probablemente representan contaminación por el 1-3 % de células CD24⁻ que están normalmente presentes en la población CD24⁺ clasificada. Como alternativa, los pequeños crecimientos han surgido de células cancerosas CD24⁺ que tenían una capacidad proliferativa reducida. Actualmente no se puede distinguir entre estas dos posibilidades. Sin embargo, todas las células que produjeron tumores palpables en este modelo de xenoinjerto fueron B38.1⁺CD44⁺CD24⁻.

Varios antígenos asociados con tipos celulares normales, a los que se hace referencia colectiva como marcadores LINEAGE (CD2, CD3, CD10, CD14, CD16, CD19, CD31, -CD45, -CD64 y -CD140b), se encontraron no expresados por las células cancerosas basándose en análisis de tumores que se habían pasado varias veces en ratones. Al eliminar las células LINEAGE⁺, los leucocitos humanos normales, las células endoteliales, y los fibroblastos se eliminaron, especialmente de tumores no pasados o de primer pase.

El análisis por citometría de flujo de cuatro de los tumores establecidos en ratones NOD/SCID reveló que todos estos tumores fueron heterogéneos con respecto a la expresión de B38.1, CD44, y CD24 (véase, por ejemplo, la FIG. 7A, la FIG. 7B). Sin embargo, cada uno de los tumores contenía una población distinta de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}. En cuatro tumores independientes que se analizaron después de un pase en ratones NOD/SCID, la frecuencia de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo} fue de $9,5 \pm 4,5$ % (media $\pm$ desviación estándar) de células tumorales humanas vivas. Siete semanas después de la inoculación, los sitios de inyección de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo} LINEAGE⁻ y de células B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ se examinaron mediante histología. Los sitios de inyección de B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ contenían tumores mayores de 1 cm de diámetro mientras que los sitios de inyección B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ no contenían tumores detectables. Solo se observó tejido mamario de ratón normal mediante histología en los sitios de las inyecciones de B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ (FIG. 7 K), mientras que los tumores formados a partir de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ contenían células malignas, según se juzgó por la morfología en las secciones teñidas con hematoxilina y eosina (FIG. 7L). Incluso cuando se examinaron los sitios de inyección de B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ tras 11 semanas, no se detectaron tumores.

Enriquecimiento de células tumorigénicas usando marcadores B38.1, CD44, CD24, y LINEAGE. T1, T2, y T3, un tercer tumor que se había pasado una vez en ratones NOD/SCID, se ensayaron para determinar si las células tumorigénicas podían enriquecerse basándose en la expresión de los marcadores B38.1, CD44, CD24 y LINEAGE. En todos los casos, las células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo} se enriquecieron de manera destacada para células tumorigénicas. Cuando se inyectaron células T1 o T2 no clasificadas, 5×10^4 dieron lugar a un tumor de manera consistente, pero 10^4 dio lugar a tumores en solo una minoría de los casos (TABLA 6). Por el contrario, cuando se aislaron células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ de T1 o T2 (FIG. 7), tan pocas como 10^3 células de esta población fueron capaces de dar lugar a tumores en todos los casos (TABLA 6, FIG. 7 J y FIG. 7L). Las células que eran B38.1⁺CD44⁺LINEAGE⁻ pero CD24⁺ no lograron formar tumores. Estos datos indican que la población B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ está enriquecida en al menos 10 veces respecto de la capacidad para formar tumores en ratones NOD/SCID en relación a las células tumorales no fraccionadas. Esta población supuso un 4-17 % de las células en T1 y T2 (5-23 % de células cancerosas).

EJEMPLO 7

ANÁLISIS DE CÉLULAS TUMORALES PRIMARIAS HUMANAS

Para descartar la posibilidad de que la actividad tumorigénica en la población enriquecida del EJEMPLO 7 surgiese como resultado de su propagación en el modelo de xenoinjerto, se aislaron células de cáncer de mama de efusión pleural no congeladas basándose en la expresión de CD44 y CD24. Aproximadamente un 11 % de las células neoplásicas eran CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ y el 75 % CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻. Todas las tres inyecciones de 100.000 células CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻, pero ninguna de las de CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻, formaron tumores (TABLA 6). A continuación se ensayó si la población B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo} de especímenes de tumor mamario no pasados (FIG. 7I) era tumorigénica. De los cuatro tumores independientes que se analizaron después de pasarlos en ratones, solo hubo suficientes células congeladas no pasadas disponibles de T1 para permitir efectuar la citometría de flujo. Además, se analizaron las células no pasadas congeladas de un quinto paciente (T5). El cinco por ciento de células T1 no pasadas y el 35 % de células T5 no pasadas fueron B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻.

Todas las 40.000 células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ o las 40.000 células B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ que se aislaron mediante citometría de flujo de T1 no pasado se inyectaron en un solo ratón. A partir de las células T5 no pasadas, 60.000-100.000 células de las poblaciones B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ (FIG. 7I) y B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ (FIG. 7F) se aislaron e inyectaron en cada uno los tres ratones NOD/SCID. La población CD24^{-/lo} formó tumores a partir de las células T1 y en 2 de 3 de células de T5, pero la población CD24⁺ nunca formó tumores, lo que demuestra que la población tumorigénica identificada en los tumores pasados también existió en las muestras de T1 y T5 no pasadas. Cuando se analizaron tumores que surgieron de células T1 no pasadas, la frecuencia de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ fue similar en muestras de T1 tanto pasadas como no pasadas.

TABLA 6

Las células tumorigénicas de mama están altamente enriquecidas en la población CD44 ⁺ B38 ⁺ CD24 ^{-/lo}									
Número de tumores/número de inyecciones para cada dosis de células									
Células / inyección	5x10 ⁵	1x10 ⁵	5x10 ⁴	2x10 ⁴	1x10 ⁴	5x10 ³	1x10 ³	5x10 ²	2x10 ²

Células T1 (xenoinjerto)									
No clasificadas	4/4	4/4	6/6	-	2/6	-	0/6	-	-
B38.1 +CD44 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
ESA ⁺ B38 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	-	-	-	8/8*	2/2	1/2
ESA ⁻ B38 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	-	-	-	0/8*	0/2	0/2
Células T2 (xenoinjerto)									
No clasificadas	4/4	4/4	4/4	-	1/6	-	0/6		
B38.1 +CD44 ⁺ CD24 ⁺	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
Células T3 (xenoinjerto)									
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD2 ⁺	-	-	-	-	0/2	-	-	-	-
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻	-	-	-	-	2/2	-	-	-	-
Células de T5 (células primarias)									
CD44 ⁺ CD24 ⁺		0/3							
CD44 ⁺ CD24 ⁻		3/3							
Células de T1 (células primarias)									
B38.1 +CD44 ⁺ CD24 ⁺			0/1						
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻			1/1						
Células de T6 (células primarias)									
B38.1 +CD44 ⁺ CD24 ⁺		0/1	0/2						
B38.1 ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁻		1/1	1/2						

Las células se aislaron del primer pase de células de tumor T1, de tumor T2, o de tumor T3. Las células B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/LINEAGE⁻ y B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ se aislaron mediante citometría de flujo tal como se describe en la FIG. 3. Se inyectó el número indicado de células de cada fenotipo en el panículo adiposo mamario de ratones NOD/SCID. Se indica el número de tumores que se formaron de inyecciones de cada grupo de células. Nótese que el aislamiento de células B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/LINEAGE⁻ da como resultado un enriquecimiento de más de diez veces en células tumorigénicas y que no surgieron tumores de la inyección de células B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻. Cuando se clasificaron las células como ESA⁺ además de como B38.1⁺CD24⁻, las inyecciones de tan pocas como 200 células dieron lugar a un tumor, un enriquecimiento de aproximadamente 50 veces en la tumorigenicidad en relación a las células no clasificadas. *para estas inyecciones se usaron 2 x 10⁵ células en lugar de 1 x 10³.

EJEMPLO 8

CARACTERIZACIÓN ADICIONAL DE LAS POBLACIONES CELULARES DE UN TUMOR DE CÁNCER DE MAMA

- 5 En un tumor, las células tumorigénicas se enriquecieron adicionalmente seleccionando el subconjunto ESA⁺ de la población B38.1⁺CD44⁺CD24⁻/LINEAGE⁻. Cuando se aislaron células ESA⁺CD44⁺CD24⁻/LINEAGE⁻ a partir de T1 (FIG. 8 A), tan pocas como 200 células de esta población fueron capaces de dar lugar a un tumor, mientras que la inyección de 2.000 células B38.1⁺CD24⁻/LINEAGE⁻ pero ESA⁻ no logró formar tumores en ninguno de los casos (TABLA 6). Se
- 10 necesitaron al menos 10.000 células no fraccionadas para formar cualquier tumor. Por lo tanto, la población ESA⁺B38.1⁺CD24⁻/LINEAGE⁻ estaba enriquecida al menos 50 veces respecto de la capacidad para formar tumores en relación a las células tumorales no clasificadas. La población ESA⁺B38.1⁺CD24⁻/LINEAGE⁻ supuso un 2-4 % de las células T1 (2,5-5 % de células cancerosas). Las células ESA⁺B38.1⁺CD24⁻/LINEAGE⁻ y las no tumorigénicas se
- 15 examinaron mediante citología y ambas poblaciones consistieron en células malignas que eran virtualmente indistinguibles en cuanto a su apariencia.

EJEMPLO 9

USO DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER PARA MEJORAR LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

En cultivo tisular, se sabe desde hace tiempo que solo una minoría de las células de tumor primario es capaz de formar colonias. De acuerdo con el modelo de célula madre de tumor sólido, aunque la población no tumorigénica de células podría conservar cierta capacidad para proliferar, la población tumorigénica de células podría tener una mayor capacidad para hacerlo. Se sembraron cantidades iguales del fenotipo tumorigénico y de las células no tumorigénicas, aisladas bien directamente de un tumor primario o del tumor T1 y el tumor T4 que crecían en ratones, a densidad clonal en placas de cultivo tisular y se midió la formación de colonias. Las células primarias de paciente fueron de una alícuota de células primarias congeladas de un tumor que forma fácilmente una línea celular de cáncer de mama y que prolifera bien en cultivo tisular.

La citología mostró que cada población contenía células cancerosas de origen epitelial (FIG. 9).

Inicialmente, se formaron colonias no solo de las células tumorigénicas, sino que en algunos casos también de las células no tumorigénicas (FIG. 9). Sin embargo, en el día doce, las colonias formadas por las células tumorigénicas habían crecido mientras que las células no tumorigénicas habían muerto (FIG. 9). En el día 14, solo las células B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ formaron numerosas grandes colonias de células cancerosas (FIG. 9C).

Se pasaron estas células en cultivo tisular a lo largo de 3 pases, y las células neoplásicas epiteliales continuaron proliferando. Por el contrario, las células no tumorigénicas solo fueron capaces de formar pequeñas colonias que consistían en 2-4 células que dejaron de proliferar tras unos pocos días (FIG. 9C).

Estos resultados ilustran dos puntos importantes. En primer lugar, el fenotipo de las células madre no es un defecto del ensayo en ratón inmunodeficiente. El hecho de que la población de células fenotípicamente idéntica tenía capacidad proliferativa aumentada tanto en el modelo de xenoinjerto de ratón como en los ensayos *in vitro* demuestra que esta población es la población tumorigénica de células encontrada en pacientes con cáncer de mama.

En segundo lugar, al menos algunas de las células no tumorigénicas tienen la capacidad de proliferar de manera limitada. Esto demuestra que los marcadores usados para identificar la población no tumorigénica no solo fueron la selección de células que carecían de viabilidad.

Estos resultados de este EJEMPLO proporcionan una solución al problema de que el uso del ensayo clonogénico *in vitro* para predecir la sensibilidad a fármaco de quimioterapia no predice con frecuencia la respuesta de un paciente particular a la terapia. En uno de los tumores usados en este EJEMPLO, la población de células no tumorigénicas formó colonias al menos de manera igual de eficiente que las células tumorigénicas (las células madre de tumor sólido de la invención) en el día 4. Al usar este tumor para un ensayo de exploración de fármacos, si las células no tumorigénicas y tumorigénicas que son clonogénicas responden de manera diferente *in vitro* a un compuesto de ensayo particular, entonces el ensayo, en especial si se puntúa de manera temprana, podría no haber reflejado la capacidad del compuesto de ensayo para eliminar células de cáncer de mama *in vivo*.

EJEMPLO 10

LA POBLACIÓN DE CÉLULAS MADRE REGENERA LAS POBLACIONES DE CÉLULAS TANTO DE CÉLULAS MADRE COMO NO TUMORIGÉNICAS

De acuerdo con el modelo determinista de célula madre de tumor sólido (FIG. 1 B), las células tumorigénicas B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ de tumores contenían células tumorigénicas adicionales B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ así como poblaciones fenotípicamente heterogéneas de células no tumorigénicas. Los modelos clásicos sugerían que los tumores que se forman a partir de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ consisten únicamente en números expandidos de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻.

Los tumores que surgen a partir de 1.000 células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ se disociaron y analizaron mediante citometría de flujo respecto de la expresión de B38.1, CD44 y CD24 (FIG. 10). Como se esperaba a partir del modo de modelo de célula madre de tumor sólido determinista, las células obtenidas de un tumor que surge a partir de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo} trasplantadas fueron heterogéneas respecto de la expresión de todos los marcadores (FIG. 10C y la FIG. 10F). En ambos casos, el patrón de expresión de marcadores de las células aisladas del tumor iniciado por las células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ fue similar a aquel de los tumores originales (compárese la FIG. 10 A y la FIG. 10B con la FIG. 10C y la FIG. 10F. Ninguna de las poblaciones B38.1⁺CD44⁺CD24⁺LINEAGE⁻ dio lugar a nuevos tumores.

Este EJEMPLO demuestra que la población B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ da lugar a tanto a células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ tumorigénicas como a células no tumorigénicas fenotípicamente distintas.

EJEMPLO 11

EXPRESIÓN DE POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS POR LAS DIFERENTES POBLACIONES DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

En el modelo determinista de célula madre de tumor sólido (FIG. 1 B), la expresión de genes por las poblaciones tumorigénicas y no tumorigénicas de células tumorales puede diferir. Por consiguiente, la incapacidad de los tratamientos actuales para el cáncer para mejorar de manera significativa el desenlace se debe a la tendencia de los agentes terapéuticos a dirigirse a células no tumorigénicas pero no a las escasas células madre de tumor sólido tumorigénicas. Si solo se eliminasen las poblaciones no tumorigénicas mediante terapias particulares, los tumores encogerían, pero las demás células madre de tumor sólido tumorigénicas pueden dirigir el recrecimiento del tumor.

Se examinaron células T1 de primer pase respecto de la expresión del receptor de EGF (EGF-R) o de HER2/neu. El EGF-R y HER2/neu son dianas terapéuticas potenciales que se han implicado en la proliferación de células de cáncer de mama. Las células T1 tumorigénicas se tiñen con niveles menores de anticuerpo anti-EGF-R que las células no tumorigénicas, y la expresión de EGF-R no pudo detectarse a nivel de células individuales en células tumorigénicas (FIG. 11).

Para ensayar si las células que no expresaban niveles detectables del EGF-R eran tumorigénicas, se inyectaron 1.000-2.000 células EGFR^{B38.1+} CD24^{LINEAGE}⁻ en ratones NOD/SCID. Se formaron tumores en cuatro de cuatro casos, lo que confirma que las células EGF-R⁻ son tumorigénicas. Por el contrario, no se pudo detectar una diferencia sustancial en la expresión de HER2/neu entre células de T1 tumorigénicas y no tumorigénicas (FIG. 11 B y la FIG. 11E).

Tal como se esperaba a partir del modelo de célula madre de tumor sólido, 1.000-2.000 células HER2/neu^{B38.1+}CD24^{LINEAGE}⁻ dieron lugar a tumores en cuatro de cuatro casos. Este EJEMPLO demuestra que puede haber diferencias en la expresión de dianas terapéuticas entre las poblaciones tumorigénicas y no tumorigénicas.

Estos experimentos sirven como prueba de principio del presente modelo de célula madre de cáncer sólido y demuestran lo siguiente:

- (a) las células tumorales son fenotípica y funcionalmente heterogéneas;
- (b) al separar las células mediante FACS se puede enriquecer para células tumorigénicas; y
- (c) al estudiar las fracciones tumorigénicas, se pueden aislar células madre de tumor sólido para enfocar de manera más cuidadosa ensayos moleculares y biológicos.

EJEMPLO 12

PRUEBAS ADICIONALES PARA UN PAPEL DE NOTCH EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MAMARIAS

Para determinar si Notch era un marcador de células madre de tumor sólido, se clasificaron células Notch 4⁺ y Notch 4⁻ y se analizó su capacidad para formar colonias *in vitro*. De manera sorprendente, ninguna de las poblaciones creció en cultivo tisular.

Hubo dos posibles explicaciones para estos resultados. En primer lugar, la interacción entre las dos poblaciones de células puede ser necesaria para el crecimiento celular. Como alternativa, el anticuerpo puede ser bien un agonista o un antagonista de Notch 4 y la inhibición o la activación del receptor puede inhibir el crecimiento de células tumorales. Para distinguir entre estas posibilidades, las células tumorales no separadas se incubaron con el anticuerpo anti-Notch 4, y después se ensayaron respecto de la capacidad para formar colonias *in vitro* en medio de cultivo tisular que contenía Delta soluble, un ligando de Notch. Delta fue esencial para la formación de colonias a partir de células aisladas de este tumor. Aunque las células de control crecieron en cultivo tisular y formaron colonias (FIG. 12 A), las células incubadas con el anticuerpo de Notch 4 no crecieron (FIG. 12 B). Cuando se preincubó el anticuerpo anti-Notch 4 con el péptido usado para generar el anticuerpo (este péptido debe en teoría bloquear la unión del anticuerpo a las células), se restauró la capacidad de las células tumorales para formar colonias (FIG. 12C). Un anticuerpo anti-Notch 2 no afectó a la formación de colonias.

Para confirmar que Notch regula la formación de colonias por células tumorales, las células se incubaron en medio con o sin Delta soluble (FIG. 12 A y la FIG. 12D, respectivamente). Los cultivos con Delta formaron muchas colonias (FIG. 12 A), mientras que solo se formaron unas pocas colonias pequeñas en medio que carecía de Delta soluble o en cultivos que usaban células expuestas al anticuerpo anti-Notch 4 (FIG. 12 B, La FIG. 12D, y FIG. 12E). En su conjunto, estos datos sugieren que la ruta de Notch 4 regula la proliferación/supervivencia de células de cáncer de mama en células y que el anticuerpo anti-Notch 4 bloquea la activación *in vitro*.

También se ensayó si el anticuerpo anti-Notch 4 inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama *in vivo*. Para hacer esto, 20.000, 10.000 o 5.000 células tumorigénicas se incubaron con el anticuerpo anti-Notch 4 o con el

anticuerpo anti-Notch 4 y el péptido bloqueante. El anticuerpo retrasó la aparición de tumores en una semana cuando se inyectaron 20.000 o 10.000 células tumorigénicas, y en 13 días cuando se inyectaron 5.000 células. Esto sugiere que el anticuerpo puede bloquear la formación de tumores *in vivo*.

Entonces se ensayaron cuatro líneas celulares de cáncer de mama respecto de la expresión de Notch 4 y la inhibición del crecimiento mediante el anticuerpo anti-Notch 4. Se descubrió que las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SKBR-3 expresaron Notch 4 y que el anticuerpo anti-Notch 4 inhibió el crecimiento de estas células. La RT-PCR demostró que ambas expresaron Notch 4. Para determinar si el anticuerpo anti-Notch 4 inhibe el crecimiento, se incubaron 5.000 células MCF-7 con el anticuerpo anti-Notch 4, con el anticuerpo anti-Notch 4 y el péptido usado para generar el anticuerpo, o con un anticuerpo de control irrelevante. El anticuerpo anti-Notch 4 inhibió la formación de colonias de ambas líneas celulares en más de diez veces.

Este EJEMPLO demuestra que la activación de Notch 4 promueve la proliferación/supervivencia de células madre de tumor sólido y que el anticuerpo anti-Notch 4 bloquea la activación del receptor.

EJEMPLO 13

USO DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA COMO DIANA CON UN VECTOR DE SUICIDIO DE TERAPIA GÉNICA

La línea de células madre de cáncer de mama comprende una minoría de las células en un tumor mamario. Es un objeto de la invención que las estrategias de terapia génica se dirijan a estas células (FIG. 13).

Se dirigieron vectores víricos a células madre de cáncer de mama usando marcadores expresados por las células madre. Para hacer esto, se tiñeron diferentes líneas celulares con el anticuerpo de B38.1 y se analizaron mediante citometría de flujo. Las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, SKBR3, T47D y BT474 fueron altamente positivas. Se conjugaron los anticuerpo anti-fibra y de B38.1 con el método Prolinx (Prolinx, Inc., Bothell, WA, EE.UU.) (FIG. 14, véase Douglas JT et al., Nature Biotechnology. 14(11):1574-8 (1996)). Cuando se mezclaron juntos los anticuerpos modificados anti-pomo y anti-B38.1, se reticularon y formaron el conjugado biespecífico (FIG. 15). La parte de anticuerpo anti-fibra del conjugado se une al adenovirus, mientras que el resto anti-B38.1 se une a la célula madre de cáncer de mama. La incubación del virus AdLacZ solo con anti-fibra bloquea la infectividad del virus (FIG. 16). Si se incubaba el virus con el conjugado biespecífico, se restaura la infectividad solo en las células que expresan altos niveles de antígeno B38.1 (FIG. 18). El direccionamiento es específico, ya que puede inhibirse con anticuerpo de B38.1 libre (FIG. 18).

La conclusión es que el nuevo conjugado biespecífico modifica la infectividad del adenovirus, bloqueando su tropismo natural y dirigiendo la infección a células que expresan el marcador de superficie de la célula madre de cáncer de mama.

EJEMPLO 14

DIANAS AGUAS ABAJO EN LAS CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA

Los métodos usados en este EJEMPLO proporcionan orientación para el desarrollo de terapias relacionadas con Notch y otras terapias anticáncer usando las células madre de cáncer de la invención. Se usa tecnología de matriz para comenzar a entender las rutas moleculares que pueden estar reguladas por la señalización de Notch inducida por ligandos de Notch específicos. Los ADNc humanos de secuencia verificada de Research Genetics, proporcionados por la University of Michigan Microarray Network, se dispusieron matricialmente por la Cancer and Microarray Facility. Se prepararon sondas a partir de células madre de cáncer de mama que se renuevan solas o de células de las diversas poblaciones de células encontradas en un tumor. Se hibridan las sondas a las matrices y se leen los patrones de hibridación por la Cancer and Microarray Facility. Entonces se analizaron los patrones de hibridación para identificar genes que hibridan con sondas de las células madre de cáncer de mama estimuladas con diversos ligandos de Notch y células no estimuladas. Dichos genes pueden representar a aquellos que están implicados en la regulación de la supervivencia o auto-renovación de las células de cáncer de mama.

Preparación de micromatrices. Se ha usado la tecnología de micromatrices para analizar la expresión génica de células madre hematopoyéticas. En este caso se extiende este trabajo a células madre de cáncer de mama.

La University of Michigan Microarray Network tiene actualmente 32.500 ADNc humanos de secuencia verificada de Research Genetics. Se ha ensamblado una microplaca de "cáncer" en colaboración con el NCI. Esta microplaca contiene una constelación exhaustiva de 1.200 genes implicados en la proliferación y la tumorigénesis. También hay una "microplaca de apoptosis" desarrollada por la Universidad de Michigan que contiene todos los genes conocidos por estar involucrados en la muerte celular programada. Nótese que los genes HES, que se sabe que son dianas aguas abajo de Notch, están incluidos en las matrices.

Preparación de sondas a partir de células madre de cáncer de mama. Se aísla ARN mensajero bien a partir de células madre de cáncer recién purificadas o de células madre de cáncer de mama incubadas en presencia o ausencia de diversos ligandos de Notch. El ARN se amplifica en caso necesario, tal como mediante PCR o amplificación de ARN lineal; Wang et al., Nature Biotechnology. 18: 457-459 (Abril de 2000). Las sondas se preparan mediante la transcripción inversa a partir de un cebador de oligo-dT, y se marcan incorporando nucleótidos conjugados a CY3 o a CY5. Los perfiles de expresión génica se examinan usando sondas preparadas a partir de células de cáncer de mama recién aisladas no cultivadas, así como de células de cáncer de mama cultivadas, tales como células que se han expuesto a los ligandos de Notch adecuados (incluyendo miembros de la familia de Fringe, bien individualmente o en combinación tal como se determinó mediante los ligandos que se expresaron por las diferentes poblaciones de células tumorales. Para efectuar estos ensayos, se expuso a las células a una forma soluble de miembros de la familia de Delta o de Jagged en los que se había eliminado la región transmembrana, o uno de los miembros de Fringe. Los miembros de Fringe son proteínas secretadas. Se produjeron proteínas recombinantes de cada ligando de Notch de las familias Delta, Jagged y Fringe de células de insecto o células de mamífero transfectadas con un baculovirus o vector de expresión en mamífero, respectivamente.

Se efectuaron comparaciones de los patrones de expresión génica entre células tumorigénicas de cáncer de mama de control y células tumorigénicas expuestas a diversos ligandos de Notch. La sonda procedente de células madre de cáncer de mama de cada tumor se combina con sonda marcada con un flúor diferente producido a partir de células madre de cáncer de mama cultivadas expuestas a diversos ligandos de Notch para comparar sus patrones de hibridación. Para hacer esto, las células madre de cáncer de mama se aíslan mediante FACS. Las células se siembran a una densidad de células individuales para imposibilitar las interacciones de Notch entre células. Las células se exponen a formas solubles de Delta (véase el EJEMPLO 6), Delta-like, Jagged 1, Jagged 2, o cada uno de los miembros de Fringe. Las células se exponen a cada proteína tanto solas como en combinaciones sugeridas por el patrón de expresión de ligando de Notch de las poblaciones de células individuales. Las micromatrices hibridadas con sonda de cada condición de ensayo se comparan y analizan para obtener una visión de las rutas moleculares afectadas por las interacciones del ligando de Notch. Por ejemplo, si una población particular de células expresa Delta y Manic Fringe, entonces se expone un grupo de células madre de cáncer de mama solo a Delta, una segunda a Delta y a Manic Fringe y una tercera solo a Manic Fringe. Se produce ADNc de cada población con marcaje de Cy5 o Cy3, y se usa para sondear una placa de micromatriz. Además, se usa el ADNc de cada población con ADNc producido a partir de células cultivadas en medio de control y células madre de cáncer de mama recién aisladas para sondear la placa de micromatriz. Cada grupo se compara 5 veces para asegurarse de que cualquier diferencia en los perfiles de expresión de los genes dispuestos matricialmente por cada grupo de ensayo son reales.

Preparación de sonda a partir de células tratadas con el anticuerpo anti-Notch 4. Un anticuerpo contra Notch 4 inhibe el crecimiento *in vitro* y la tumorigénesis *in vivo*. Este efecto puede explicarse si el anticuerpo actúa bien como agonista o como antagonista de Notch 4. Ya que Delta soluble promueve el crecimiento de células cancerosas *in vitro*, el anticuerpo es más probablemente un antagonista de Notch 4.

Para confirmar el mecanismo mediante el cual el anticuerpo anti-Notch 4 inhibe el crecimiento tumoral, se produce sonda de células incubadas en presencia o ausencia del anticuerpo anti-Notch 4 o de control irrelevante y las diversas combinaciones de los ligandos de Notch y se usan para análisis de expresión de micromatriz tal como se describe anteriormente. Otro grupo de control incluye células incubadas con los anticuerpos y sin ligando de Notch. Cada comparación se efectúa en al menos seis pruebas independientes que emplean lotes de sonda preparados de manera individual. Al comparar los patrones de expresión génica de cada grupo, se debe ser capaz de determinar cómo afecta el anticuerpo anti-Notch 4 a la señalización de Notch.

Producción de la sonda de ADNc. Normalmente se usan 1-2 µg de ARNm para sintetizar sonda para la exploración de perfiles de expresión génica en micromatrices (Wang et al., Nature Biotechnology. 18: 457-459 (Abril de 2000)). Ya que se exploró un conjunto de tres portaobjetos (que contenía un total de 32.500 ADNc) en cada ensayo, se necesitan 6 µg de ARNm por cada ensayo (la transcripción inversa de 6 µg de ARNm debe producir aproximadamente 3 µg de sonda de ADNc, o 1 µg de sonda por portaobjetos). Las células cancerosas tienden a tener un alto contenido de ARN. En ensayos anteriores, 10⁷ células cancerosas produjeron aproximadamente 100 µg de ARN total, que a su vez produjeron aproximadamente 3 µg de ARN poli A⁺. Por lo tanto, para generar 6 µg de ARNm, se necesitarían aproximadamente 2 x 10⁷ células. Tal como se describe en los datos preliminares, ese número de células madre de cáncer de mama purificadas por citometría de flujo pueden aislarse a partir de cinco-diez tumores de 1 cm.

Las células madre de cáncer de mama representan aproximadamente un 5 % del número total de células en un tumor. No es práctico aislar más de 10⁶ células madre recién disociadas (no cultivadas) de cáncer de mama mediante citometría de flujo en un solo día. Esto produciría menos de 0,5 µg de ARNm a partir de un día de clasificación. Aunque la célula madre de cáncer de mama puede combinarse de múltiples días de clasificación para agrupar ARNm suficiente como para preparar sonda a partir de células recién aisladas, puede no ser práctico efectuar todos los ensayos de este modo. Algunos ensayos requieren de breves periodos de tiempo de cultivo tisular. La eficacia de la siembra de las células clasificadas es de aproximadamente el 10 %. Por lo tanto, puede ser necesario amplificar enzimáticamente el molde antes de sintetizar la sonda. Esto puede efectuarse bien mediante PCR o mediante amplificación lineal de ARN usando ARN polimerasa de T7. El presente protocolo emplea 15-18 rondas de PCR para amplificar ADNc a partir de números pequeños de células madre. Este protocolo se usó para

construir una biblioteca de ADNc de célula madre hematopoyética (HSC) de alta calidad y para producir sonda a partir de células madre hematopoyéticas. Para producir sonda a partir de células madre de cáncer de mama recién aisladas, se probó la misma estrategia. Como alternativa, una serie de grupos han comunicado éxito al usar amplificación de ARN lineal para producir sonda para hibridación de micromatrices. Por lo tanto se compararon los dos métodos preparando sonda de ambas maneras y examinando los patrones de hibridación que se obtienen como resultado. El ADNc se ceba usando un cebador de oligo-dT que contiene un sitio de unión a ARN polimerasa de T7 y se sintetiza con transcriptasa inversa Superscript (Gibco) y el oligómero interruptor 5' de Clontech que permite el marcaje del extremo 5' del ADNc. La segunda hebra de ADNc se sintetiza usando ADN polimerasa de *E. coli*. Después se produce el ARN amplificado (ARNa) usando ARN polimerasa de T7 o PCR. La determinación de cuál de los dos métodos de amplificación se efectúa comparando sonda producida mediante síntesis de ADNc convencional. Después de preparar el ARNa, se vuelve a sintetizar el ADNc usando hexámeros aleatorios. Este ADNc puede usarse entonces para sondear, o en caso necesario, pueden efectuarse rondas adicionales de amplificación. Ambas estrategias se usan para preparar sonda a partir de 40.000 células MCF-7 (una línea de células madre de cáncer de mama humano). Esta sonda se hibrida a micromatrices de ADNc junto con sonda a partir de las células MCF-7 no amplificadas. Se selecciona la estrategia de amplificación reproduce de manera más estrecha el patrón de hibridación de la sonda no amplificada. Después se modifican las condiciones de amplificación hasta que la sonda amplificada reproduce el patrón de hibridación de la sonda no amplificada de la manera más fiel posible.

Análisis del patrón de hibridación. Los patrones de hibridación se analizan en el Cancer and Microarray Core facility usando su sistema de barrido de láser. El uso de un sistema integrado para disponer matricialmente, hibridar, escanear y analizar patrones de hibridación en el que todos los componentes se proporcionan por Genomics Solutions permite un análisis eficaz y sin fisuras de los patrones de hibridación.

Se expresa de manera diferencial un transcrito si hay al menos una diferencia de 3 veces en los niveles normalizados de hibridación entre sondas. Las señales de hibridación de sondas marcadas con Cy3 y Cy5 en una sola prueba se normalizan entre sí para corregir diferencias potenciales en la concentración eficaz de cada sonda y se efectúan replicados de cada prueba usando el flúor opuesto para cada grupo para corregir las diferencias en las cantidades o eficacia del marcado de las sondas.

Verificación de la expresión diferencial. Los ADNc que hibridan de manera consistente con sonda de grupos de células pero no con sonda de los grupos de control de células se caracterizan adicionalmente. Las secuencias de estos ADNc se obtienen de la Microarray Network. Se usan dos estrategias para confirmar la expresión diferencial de genes candidatos entre poblaciones de células. En primer lugar se preparan sondas de hibridación *in situ* contra genes candidatos, y después se efectúan hibridaciones *in situ* en células madre de cáncer de mama cultivadas en medio con o sin diversos ligandos de Notch tal como se han descrito anteriormente. Entonces se efectúan hibridaciones *in situ* en las células cultivadas. La ventaja de esta estrategia sería que se puede comparar la expresión a nivel de las células individuales.

Una estrategia alternativa es diseñar cebadores de PCR anidados contra genes candidatos, y efectuar RT-PCR en múltiples alícuotas de 1-10 células de células madre de cáncer de mama recién purificadas (aisladas tal como se ha descrito anteriormente). Al efectuar la RT-PCR en pequeños números de células es posible observar una diferencia en la capacidad para amplificar transcritos concretos, incluso si la población "no expresora" contiene células expresoras raras. Se usó esta estrategia para demostrar la expresión diferencial de RGS18 entre diferentes subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos multipotentes.

La expresión diferencial puede confirmarse mediante análisis de Northern. El ARN poli A⁺ de 1-2 x 10⁷ células madre de cáncer de mama cultivadas con o sin ligandos de Notch, se hibrida a sondas de los ADNc expresados de manera diferencial. Las señales de hibridación se comparan de manera cuantitativa entre estas muestras.

Entonces se confirma que los genes se expresan de manera diferencial a nivel de proteína. EN los casos donde la tinción inmunohistoquímica no es informativa, también se pueden efectuar transferencias de Western en proteínas de diferentes células.

Algunos análisis moleculares son difíciles usando las células de cáncer de mama primario que solo proliferan durante periodos prolongados de tiempo en el modelo de xenoinjerto. Estos análisis pueden efectuarse en todas las líneas celulares. Se puede usar cualquiera de un gran número de líneas celulares de cáncer de mama, incluyendo pases tempranos de líneas que se hayan estudiado en el pasado. Clarke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92: 11024-28 (Noviembre de 1995); Hernandez-Alcoceba et al., Human Gene Therapy. 11(11): 20 (Septiembre de 2000). Estas líneas celulares se siembran a densidad de células individuales con y sin diversos ligandos de Notch, así como los anticuerpos anti-Notch 4 o de control tal como se describe en los ensayos con las células de cáncer de mama primarias. Si la clonogenicidad se ve afectada por la señalización de Notch, entonces se produce sonda para el análisis por micromatriz usando ADNc producido a partir de la línea celular incubada en medio con o sin los diversos ligandos de Notch o los anticuerpos anti-Notch 4 o de control. Ya que puede analizarse virtualmente un número ilimitado de células, se puede producir sonda que no se haya analizado.

Finalmente, se usan líneas celulares para confirmar si el anticuerpo anti-Notch 4 es un agonista o antagonista. Si se identifica en una línea celular que la clonogenicidad está potenciada por Delta soluble e inhibida por el anticuerpo anti-Notch 4, entonces se usa en estos ensayos. Las células se transfectan de manera estable con un minigen de luciferasa bajo el control del promotor HET-1 inducible por Notch. Jarriault et al., Molecular & Cellular Biology. 18(12): 7423-31 (Dic. 1998). Las células se siembran a densidad de células individuales para evitar las interacciones célula-célula de ligando de Notch. Estas se tratan con las diversas combinaciones de ligandos de Notch y bien con el anticuerpo anti-Notch 4 o con un anticuerpo de control. Las células se recogen y se efectúa un ensayo de luciferasa para determinar cómo cada condición afecta a la transducción de señal de Notch reflejada por la transactivación del promotor de HET1.

Puede efectuarse un análisis funcional exhaustivo de genes candidatos que surgen del análisis de la micromatriz. Los ADNc de longitud completa se aíslan y clonan en un vector de expresión retroviral. Las líneas celulares de cáncer de mama y las células madre de cáncer de mama aisladas de los cinco tumores de xenoinjerto se infectan *in vitro* y se ensaya el efecto del transgén retroviral en la auto-renovación y tumorigenicidad en relación a los clones infectados con un vector de control. El transgén se expresa como un mensaje bicistrónico que contiene IRES-GFP. Esto permite la identificación de células transducidas mediante FACS o microscopía de fluorescencia. El efecto del transgén en la señalización de Notch se examina *in vitro* e *in vivo*. Para hacer esto, las células transducidas se ensayan respecto de la respuesta a diversas combinaciones de ligandos de Notch en los que se descubre que afectan a la formación de colonias en cultivo tisular y a la tumorigenicidad en ratones.

Los patrones de expresión de genes candidatos se examinan en detalle *in vivo* para determinar cómo de ampliamente se expresan los genes más allá del xenoinjerto. Además de efectuar hibridaciones *in situ* más extensivas de secciones de tejidos de trozos de cáncer de mama primario, se producen anticuerpos contra los productos génicos seleccionados que se están estudiando. El Hybridoma Core facility en la Universidad de Michigan tiene una gran experiencia en la preparación de anticuerpos monoclonales que usan ambos péptidos, y proteínas recombinantes expresadas.

En última instancia, las funciones de los genes desconocidos se ensayan *in vivo*, usando direccionamiento génico para producir ratones *knockout*. El University of Michigan Transgenic Core tiene tecnología celular ES murina establecida, proporcionan células ES que se convierten en "línea germinal" a gran velocidad y asisten en la generación de clones ES recombinantes homólogos.

La capacidad del análisis de micromatrices para comparar simultáneamente la expresión de muchos genes proporciona una potencia no igualada para explorar cambios en los patrones de expresión génica. Combinado con la capacidad para purificar células madre y para regular su auto-renovación y diferenciación *in vitro*, los análisis de micromatrices pueden aplicarse con una gran precisión para explorar respecto de tipos específicos de genes reguladores.

EJEMPLO 15

CÓMO AFECTA LA SEÑALIZACIÓN DE NOTCH A LA TUMORIGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA

Para verificar la importancia de Notch en el crecimiento y desarrollo mamario normal, se ensayaron los efectos de los ligandos de Notch o de péptidos agonistas en el crecimiento y formación de tumores de células madre de tumor mamario.

Efecto de la activación de Notch en la formación de tumores in vivo. Los efectos de las diversas combinaciones de ligandos de Notch en la formación de tumores se correlacionan con los datos micromatrices obtenidos en el EJEMPLO 14. Estos ensayos se efectúan usando células tumorales de xenoinjerto antes y después del enriquecimiento de poblaciones de células mamarias malignas, permitiendo diferencial los efectos de Notch en células tanto madre como progenitoras, respectivamente. Los efectos de los ligandos de Notch en el crecimiento y diferenciación de cada población de células cancerosas se determinan usando el ensayo *in vivo*.

Para determinar el efecto de la estimulación de Notch en el crecimiento tumoral *in vivo*, se incuban mil, diez mil, y cien mil células tumorales de cáncer de mama con ligandos solubles de Notch, solos o en combinación, o medio de control y después se inyectan (6 replicados de cada) en ratones NOD/SCID. Las formas solubles de Delta, Delta-like, Jagged 1, y Jagged 2 se usan, así como los miembros de la familia de Fringe. Las células se incuban con cada ligando de manera individual, así como combinaciones de diferentes ligandos, durante dos horas. Las células se suspenden en Matrigel® con los ligandos de Notch y después se inyectan en los ratones. Se determinan los efectos de la estimulación con cada ligando de Notch tanto en el número de células necesarias para formar un tumor como en el tiempo necesario para formar un tumor. Esto permite determinar si Notch afecta al crecimiento tumoral *in vivo*.

En EJEMPLOS anteriores, el anticuerpo anti-Notch 4 retrasó la formación de tumores tras una sola incubación breve con células. A continuación, se incuban mil, diez mil, y cien mil células tumorigénicas de cada uno de los cinco tumores de xenoinjerto se incuban bien con anticuerpo de control o con el anticuerpo anti-Notch 4 solo, o con varias combinaciones de proteínas de la familia de Delta, Jagged y Fringe. Entonces se mezcla cada grupo en Matrigel®

que contiene el mismo anticuerpo ligandos de Notch y se inyecta en ratones. Se miden los efectos del anticuerpo anti-Notch 4 en el número de células y el tiempo necesario para formar un tumor. Los resultados se correlacionan con los datos de expresión de la micromatriz, obtenidos en el EJEMPLO 14.

- 5 La estimulación de Notch debe dirigir la proliferación de las células madre mamarias normales. Al igual que en las células madre normales, los miembros de la familia de Fringe deben modular la señalización de Delta o de Jagged. Notch también debe desempeñar un papel en la auto-renovación de la célula madre de cáncer de mama.

EJEMPLO 15

10

SUJETOS HUMANOS

Se obtienen las siguientes fuentes de material humano para su uso en los métodos de diagnóstico de la invención: (1) tumores primarios de pacientes con cáncer de mama y (2) fluido pleural de pacientes con cáncer de mama metastásico. Una parte del tumor o del fluido pleural se obtiene durante el tratamiento rutinario cuando el médico del paciente considera que la eliminación del tumor o del fluido pleural está clínicamente indicada.

15

Por ejemplo, en el Hospital de la Universidad de Michigan, hay un protocolo de IRB aprobado para obtener los especímenes. Se solicita a los pacientes que firmen un consentimiento informado en los casos indicados. No hay riesgos adicionales para los pacientes.

20

EJEMPLO 16

ANIMALES VERTEBRADOS

25

La universidad de Michigan cumple con el Animal Welfare Act enmendado (7 U.S.C. § 2131 y siguientes), y otros estatutos y regulaciones Federales en relación a los animales. Se usan ratones de laboratorio de raza NOD/SCID y otras razas de ratones inmunocomprometidos, tales como ratones Beige/SCID.

30

No debe haber malestar a causa del crecimiento de células cancerosas, ya que los ratones son eutanasiados antes del desarrollo de la enfermedad. En caso de que los ratones muestren evidencias de malestar a causa de los tumores (cambios en la postura, apetito, o en el comportamiento, pérdida de peso), pueden sacrificarse inmediatamente. En caso de que los ratones muestren evidencias de un malestar más que leve (cambios en la postura, apetito, o comportamiento) se les administra analgésicos, tales como morfina o codeína por vía oral. Se inoculan a los ratones células de médula ósea en su vena retroorbital bajo anestesia con éter o con un agente anestésico general similar.

35

Los ratones son eutanasiados usando CO₂, lo que es coherente con las recomendaciones del Panel on Euthanasia de la American Veterinary Medical Association. Este método se seleccionó porque es seguro y humanitario.

40

EJEMPLO 17

ANÁLISIS DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA Y CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA NO TUMORIGÉNICAS

45

Se ensayaron células de un tumor de xenoinjerto de ratón. El estado de ciclo celular de la célula madre de cáncer de mama (FIG. 19A) y de poblaciones de células no tumorigénicas (FIG. 19B) en el tumor se determinó mediante citometría de flujo. Hubo una distribución similar de células en las fases G1, S, y G2/M del ciclo celular en ambas poblaciones. Por lo tanto, las poblaciones tumorigénicas y no tumorigénicas mostraron distribuciones del ciclo celular similares.

50

Este EJEMPLO descarta la posibilidad de que todas las células que expresaron los marcadores de célula madre de tumor sólido se encontrasen en un estado particular del ciclo celular en el tumor que se analizó. Al seleccionar células en un estado particular del ciclo celular mediante clasificación por citometría de flujo de células madre tumorales teñidas con Hoechst, puede ser posible enriquecer adicionalmente la actividad tumorigénica, tal como ha sido posible para enriquecer la actividad de células madre hematopoyéticas seleccionando células con bajos niveles de tinción de Hoechst.

55

EJEMPLO 18

60

TINCIÓN CON RODAMINA 123 DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA Y CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA NO TUMORIGÉNICAS

El fin de este EJEMPLO es examinar la actividad de la bomba de resistencia multifármaco en células madre de cáncer de mama y de las células cancerosas no tumorigénicas. Se han teñido las células ESA⁺CD44⁺CD24⁻/noLINEAGE⁻ (células madre de cáncer de mama) y las células no tumorigénicas obtenidas de uno de los xenoinjertos

65

de tumores con rodamina 123.

Uno de los factores principales que determinan la intensidad de la tinción de rodamina 123 en una célula es la actividad de la bomba MDR que elimina este colorante de las células. Yumoto R. et al., Drug Metabolism & Disposition 29(2): 145-51 (2001); Daoud R. et al., Biochemistry 39(50): 15344-52 (2000). Se descubrió que algunas de las células madre de tumor sólido de este tumor se tiñeron con menos intensidad con rodamina 123 que las células cancerosas no tumorigénicas (FIG. 20).

Este EJEMPLO demuestra la heterogeneidad de las células tumorales e indica que la actividad de la bomba MDR puede ser mayor en las células de tumores sólidos.

EJEMPLO 19

EXISTE UNA POBLACIÓN DE CÉLULAS B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ EN TUMORES DE CÁNCER DE OVARIOS

Se analizaron células cancerosas obtenidas tanto de un tumor como de fluido de ascitis obtenido de una cirugía de cito-reducción para un paciente con cáncer de ovarios. De manera notable, se sabe que B38.1 se expresa por las células de cáncer de ovario. De manera sorprendente, el análisis por citometría de flujo reveló múltiples poblaciones celulares, y hubo una población distinta de células B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ (FIG. 21).

Esta población de células distinta se asemeja fenotípicamente a la célula madre de cáncer de mama y puede representar a una célula madre de cáncer de ovario.

EJEMPLO 20

EXISTE UNA POBLACIÓN DE CÉLULAS B38.1⁺CD44⁺CD24^{-/lo}LINEAGE⁻ EN TUMORES DE SARCOMA/ COMPARACIÓN CON DATOS DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA

Se ha descrito anteriormente que el antígeno B38.1 se expresa únicamente en cáncer de mama y de ovario. Se establecieron dos sarcomas colocando células de sarcoma en los flancos de ratones NOD/SCID que habían sido tratados con VP16. Uno de los tumores se extirpó y se examinó mediante citometría de flujo. De manera sorprendente, las células de sarcoma expresaron el antígeno B38.1. Además, hubo tres poblaciones celulares distintas respecto de la expresión de CD44: alta, baja y negativa (FIG. 22).

Por lo tanto, las células de sarcoma incluyen una población CD44⁺ que se asemeja fenotípicamente a las células madre de cáncer de mama y que pueden representar a células madre de sarcoma.

TABLA 7			
Tumorigenicidad de diferentes poblaciones de células de tumor T1 y T2			
	n.º de tumores/n.º de inyecciones		
Células/inyección	8x10 ⁵	5x10 ⁵	2x10 ⁵
Células T1			
CD44 ⁻	0/2	0/2	-
CD44 ⁺	2/2	2/2	-
B38.1 ⁻	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁻	-	-	6/6
Células T2			
CD44 ⁻	0/2	0/2	-
CD44 ⁺	2/2	2/2	-
B38.1 ⁻	0/2	0/2	-
B38.1 ⁺	2/2	2/2	-
CD24 ⁺	-	-	1/6
CD24 ⁻	-	-	6/6
Se aislaron células mediante citometría de flujo tal como se describe en la figura 2 basándose en la expresión del marcador indicado y se ensayaron respecto de la capacidad para formar tumores tras la inyección de 2-8 x 10 ⁵ células en el panículo adiposo mamario de ratones NOD/SCID. El número de tumores que se formaron/el número de inyecciones efectuadas se indica para cada población de células.			

EJEMPLO 21

PREPARACIÓN DE SONDAS POLINUCLEOTÍDICAS

- 5 *Marcaje RT de una sola ronda a partir de fuente de ARN total.* Los polinucleótidos aislados de células madre de tumor sólido o de poblaciones enriquecidas de células madre de tumor sólido pueden ser ARN extraído de las células o ADN complementario (ADNc) producido a partir del ARN extraído.

- 10 Para algunas realizaciones de los métodos de la invención (tales como aquellas que implican hibridación), es útil el ADNc marcado. En una realización, se usan métodos para marcaje RT de una sola ronda a partir de una fuente de ARN total.

- 15 La calidad del ARN que entra en la reacción de marcado tendrá un efecto destacado en la calidad de la hibridación. Las preparaciones de ARN que tienen buen aspecto mediante los criterios de biología molecular pueden proporcionar malos resultados. Los problemas típicos incluyen un ruido disperso de grano fino a lo largo de toda la superficie hibridada y unión no específica de flúor a las zonas de inmovilización de ADN sobre el portaobjetos. Parece que estos problemas radican en los hidratos de carbono contaminantes, y como se esperaría para el carbohidrato, los problemas se exacerban por precipitaciones de etanol antes y después del marcaje. Las preparaciones muy impuras producen frecuentemente agregados visibles si se precipitan después de marcar y precipitar con etanol, que son esencialmente resistentes a la precipitación. Se sabe bien que los ácidos nucleicos forman agregados fuertes con hidratos de carbono cuando se secan juntos o cuando se precipitan conjuntamente. Esta interacción es la base para la "inmovilización" de ácidos nucleicos sobre soportes de cromatografía, tales como celulosa. Para minimizar esta clase de problema se recomiendan procedimientos de preparación que usen pocas o ninguna precipitación de etanol durante la preparación y marcaje de ARN. Se usaron al menos los volúmenes de soluciones de extracción y lavado sugeridas para el número de células que se estaban procesando. Los volúmenes adecuados o ligeramente en exceso de extracción/lavado tienden a minimizar el ruido en un ensayo de hibridación.

Los métodos que proporcionan resultados satisfactorios son la extracción de Triazol (BRL) y Rneasy (Qiagen).

- 30 El ARN total se prepara a partir de tejido (de tumor sólido o xenoinjerto de tumor), cultivo tisular o poblaciones enriquecidas de células madre de tumor sólido enriquecidas mediante citometría de flujo. Se resuspendió el ARN preparado en un volumen que produce una concentración de ARN de > 6 mg/ml en agua DPEC. Si se recupera el ARN de una matriz como etapa preparativa final, y todavía está muy diluido, se concentra según sea necesario para marcarlo, usando un MicroCon 30 (Amicon) determinando la concentración del ARN. Se ensayó leyendo una pequeña muestra (A260) en NaOH 50 mM.

Para la mezcla de nucleótido, se usó dNTP de bajo T 10X (usando dNTP 100 mM de Pharmacia (St. Louis, MO, EE.UU.) [27-2035-02])

TABLA 8
MEZCLA DE NUCLEÓTIDOS

<u>Nucleótido</u>	<u>μl</u>	<u>concentración final en mM (1/10)</u>
dGTP	25	0,5
dATP	25	0,5
dCTP	25	0,5
dTTP	10	0,2
agua	415	
volumen total	500	

- 40 Los nucleótidos fluorescentes son de Amersham Life Sciences o de Perkin Elmer Applied Biosystems Division. Se usa FluoroLink Cy3-dUTP (n.º 401-896) o FluoroLink Cy5-dUTP. Los nucleótidos Cy3 y Cy5 vienen a una concentración de 1 mM.

- 45 El nucleótido R110 viene a una concentración de 0,1 mM, y tiene que secarse y resuspenderse a 0,1 x el volumen inicial para llevarlo hasta 1 mM. Actualmente, los factores de eficacia de marcaje, rendimiento fluorescente, separación espectral y tendencia hacia la unión no específica hacen del par Cy3/Cy5 el más útil para el sistema de detección.

- 50 Para la reacción de marcaje, el cebador puede ser oligo (dT) 12-18 de Pharmacia (27-7858-01). Las mezclas de nucleótido no marcado se preparan a partir de soluciones madre 100 mM de Pharmacia. La transcriptasa inversa es

SuperScript II de BRL (18064-014). El tampón 5X es el tampón suministrado con la polimerasa.

Para su uso en micromatrices, se logra la normalización en un marcaje de dos flúores por referencia a genes constitutivos distribuidos a lo largo de la micromatriz.

5 Se produjo un cóctel de ADNc sintéticos usando polimerasas de ARN de fago en genes de *E. coli* clonados en el vector pSP64 poli (A) como patrón de masa y patrón de calidad de ARN. En caso posible, también se prepara una solución de ARN total que contiene 100 µg de ARN en 17 µl de agua DEPC. Por otra parte, se precipitan con etanol 100 mg de ARN total para concentrar la muestra para la reacción de marcado. Se tiene cuidado de eliminar todo el lavado de etanol al 70 % bien secando al aire o al vacío, ya que el etanol residual puede impedir la eficacia del marcado.

Se resuspendió el sedimento en agua DEPC para dar un volumen final de 17 ml. Cualquier precipitado residual se elimina mediante centrifugación. El ARN se añade al resto de la reacción.

15 Marcaje RT de nucleótido (NTP) con flúor: Se añade lo siguiente:

TABLA 9 MARCADO CON TRANSCRIPTASA INVERSA	
Componente	µl
Manteca de primera hebra 5X	8
Oligo (dT) 12-18 (500 µg/ml)	2
mezcla de NTP de dT bajo 10 X	4
Flúor dUTP (1 mM)	4
DTT 0,1 M	4
ARNpi	1
pat. de ARNm sin. (0,06 µg)	0,5
100 mg de ARN total	17,0
Total	40

20 Se agita vorticialmente la muestra después de añadir el ARNpi. Se minimizan las burbujas y la formación de espuma durante la agitación vorticial o la centrifugación rápida.

A continuación, se mantiene a 65 °C durante 5 minutos, se lleva a 42 °C (programa R1). Después, se añaden 2 µl de enzima SSII. Hay que asegurarse de que la enzima está bien mezclada en la reacción. A continuación, se incuba a 42 °C durante 25 minutos. Se añaden 2 µl de enzima SSII. Hay que asegurarse de que la enzima está bien mezclada en la reacción. Después, se incuba a 42 °C durante 35 minutos. Se añaden 5 µl de EDTA 500 mM. Hay que asegurarse de detener la reacción con EDTA antes de añadir NaOH.

30 Se añaden 10 ml de NaOH 1M. Se incuba a 65 °C durante 60 minutos para hidrolizar el ARN residual. Se enfría hasta temperatura ambiente y se añaden 25 µl de Tris-HCl 1 M (pH 7,5)

35 Para la limpieza de la sonda y el análisis, se transfiere a un Microcon 30, se concentra a aproximadamente 20 µl (aproximadamente 3,5 min a 14.000 rpm en Eppendorf 5415C). Se lava añadiendo 200 µl de TE (pH 7,5) y se concentra a aproximadamente 20 µl (4-4,5 min a 14.000 rpm). Se recupera el producto invirtiendo el concentrador sobre un tubo de recogida limpio y centrifugándolo durante 3 min a 3000 rpm.

40 En algunos casos, la sonda Cy5 puede producir un precipitado gelatinoso de color azul que se recupera en el volumen concentrado. La presencia de este material señala la presencia de contaminantes. Cuando más grave sea la contaminación, mayor será la fracción de sonda que se capturará en este gel. Incluso si se solubiliza con calor, este material tiene a formar unión uniforme no específica a las dianas de ADN.

45 Cuando se concentra por filtración de centrifugación, los tiempos necesarios para lograr el volumen final son variables. Las centrifugaciones muy largas pueden eliminar prácticamente toda el agua de la solución que se está filtrando. Después, cuando se concentran los ácido nucleicos marcados con flúor sobre el filtro de este modo, son muy difíciles de eliminar. Por lo tanto, se aproxima el volumen deseado mediante aproximaciones conservadores de los tiempos de centrifugado necesarios.

Se toma una alícuota de 2 µl de sonda Cy5 para su análisis, dejando 17-18 µl para hibridación, y después se hace correr esta sonda sobre gel de agarosa al 2 % en TAE (el tamaño del gel es de 6 cm de ancho por 8,5 cm de longitud, peine de 2 mm de ancho). Para una máxima sensibilidad cuando se hacen correr las muestras en el gel para el análisis de flúor, se usó un tampón de carga con mínimo colorante y se añade bromuro de etidio al gel o tampón de ejecución.

Se escanea el gel en un escáner de fluorescencia Storm de Molecular Dynamics (Configuración: fluorescencia roja, resolución de 200 micras, 1000 voltios en PMT). Un marcado satisfactorio produce un frotis denso de sonda de 400 pb a > 1000 pb, con poco apilamiento de transcritos de bajo peso molecular. El marcado débil y niveles significativos de material de bajo peso molecular indican un marcado malo.

Hibridación. La especie de bloqueo es poli(dA) de Pharmacia (27-7988-01) (resuspendida a 8 mg/ml); ARNt de levadura de Sigma (R8759) (resuspendido a 4 mg/ml); y ADN de CoT1 de Life Technologies Inc. (concentrado 10 veces a 10 mg/ml).

El volumen necesario para la hibridación depende del tamaño de la matriz usada. Para hibridaciones que requieren volúmenes pequeños (20-25 µl), los volúmenes de sonda después de la concentración con Microcon pueden ser demasiado grandes. En este caso, se añaden entonces los bloqueantes a la sonda Cy3 y se precipita la sonda Cy3.

Se añaden 8 mg de poli (dA); 4 mg de ARNt; y 10 mg de ADN de CoT1 por 10 µl de hibridación.

TABLA 10 MEZCLA DE SONDA DE HIBRIDACIÓN	
Sonda marcada con Cy3	~20 µl
poli dA (8 mg/ml)	1 µl
ARNt de levadura (4 mg/ml)	1 µl
ADN de CoT1 (10 mg/ml)	1 µl

Se añaden 2 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5,5), después se añaden 60 µl de etanol, se centrifuga, se seca levemente, y se resuspende en los ~17 µl de sonda Cy5. Si la matriz final requiere aproximadamente 40 µl de sonda, entonces se agrupan los concentrados de Cy3 y Cy5 y se añaden los bloqueantes directamente, de tal forma que no se necesita precipitación.

Después, se añaden 3 µl de SSC 20X por 20 µl de volumen de mezcla de hibridación. En este momento, se añade opcionalmente 1 µl de solución bloqueante de Denhardt 50X por 20 µl de mezcla de hibridación. Con una sonda muy limpia, la solución de Denhardt no produce ninguna diferencia visible.

Después, se calienta a 98 °C durante 2 minutos, se enfría a 45 °C y se añaden 0,2 µl de SDS al 10 % por 20 µl de volumen de mezcla de hibridación, y después se aplica a la matriz y se hibrida durante 16-24 horas a 65 °C en una cámara sellada humidificada.

Lavado. La sonda residual no unida se elimina de los portaobjetos lavando cada uno durante 2-5 minutos a temperatura ambiente. El primer lavado es SSC 0,5 X, SDS al 0,01 %. El segundo lavado es SSC 0,06 X. El secado al aire de los portaobjetos después de esta etapa puede dejar una neblina fluorescente sobre la superficie del portaobjetos, por lo que el tampón se elimina de los portaobjetos mediante una breve centrifugación a bajo G. Se colocan los portaobjetos en un soporte y se centrifugan en una centrifugadora equipada con un transportador oscilante (horizontal) que puede contener al soporte de los portaobjetos. La mayoría de las centrifugadoras que son adaptables para centrifugar placas de microtitulación pueden usarse con este fin.

La descripción anterior se ha presentado solo con fines ilustrativos y no pretende limitar la invención a la forma concreta divulgada, sino a las reivindicaciones adjuntas a la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para enriquecer una población de células madre de tumor sólido, que comprende las etapas de:

- (a) disociar un tumor sólido de cáncer epitelial;
- (b) poner en contacto las células disociadas con un primer reactivo que se une a CD44 y un segundo reactivo que se une a CD24; y
- (c) seleccionar células que se unen al primer reactivo y que no se unen de manera detectable o que se unen débilmente al segundo reactivo, en donde las células seleccionadas están enriquecidas en células madre tumorales.

2. Una célula madre de tumor sólido para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria para dicha célula madre de tumor sólido en un ser humano o en un sujeto animal, en donde dicha célula se ha obtenido o puede obtenerse mediante un método que comprende las etapas de:

- (a) obtener una población enriquecida de células madre de tumor sólido; en la que
 - (i) las células tumorales se obtienen de un tumor sólido o de un cáncer epitelial,
 - (ii) la célula madre de tumor sólido expresa el marcador de la superficie celular CD44;
 - (iii) la célula madre de tumor sólido expresa niveles menores del marcador CD24 que la expresión media de CD24 por células cancerosas no tumorigénicas procedentes del tumor sólido;
 - (iv) la célula madre de tumor sólido es tumorigénica;
 - (v) la población de células madre de tumor sólido está enriquecida en relación a las células tumorales no fraccionadas; y bien
- (b.1) tratar a la población para prevenir la replicación celular; o
- (b.2.1) mezclar las células madre de tumor sólido en un cultivo *in vitro* con células efectoras inmunitarias; y
- (b.2.2) retirar a las células efectoras inmunitarias del cultivo para su administración a dicho sujeto.

3. Un método para preparar una micromatriz de polinucleótidos o de polipéptidos de ARNm o de ADNc a partir de células madre de tumor sólido, que comprende purificar polinucleótidos o polipéptidos de ARNm a partir de una población enriquecida de células madre de tumor sólido, en donde:

- (a) las células tumorales se obtiene de un tumor sólido de cáncer epitelial;
- (b) la célula madre de tumor sólido expresa el marcador de la superficie celular CD44;
- (c) la célula madre de tumor sólido expresa niveles menores del marcador CD24 que la expresión media de CD24 por células de cáncer no tumorigénicas procedentes del tumor sólido;
- (d) la célula madre de tumor sólido es tumorigénica; y
- (e) la población de células madre de tumor sólido está enriquecida en relación a las células tumorales no fraccionadas, y unir los polinucleótidos o polipéptidos a un sustrato.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende retrotranscribir los polinucleótidos de ARNm purificados en ADNc, y unir el ADNc al sustrato para proporcionar una micromatriz de ADNc.

5. Un método *in vitro* para analizar una población de células enriquecidas para células madre de tumor sólido respecto de patrones de expresión génica o de proteínas, que comprende las etapas de:

- (a) obtener una población de células enriquecida en células madre de tumor sólido; en la que
 - (i) las células tumorales proceden de un tumor sólido de cáncer epitelial;
 - (ii) la célula madre de tumor sólido expresa el marcador de la superficie celular CD44;
 - (iii) la célula madre de tumor sólido expresa niveles menores del marcador CD24 que la expresión media de CD24 por células cancerosas no tumorigénicas procedentes del tumor sólido;
 - (iv) la célula madre de tumor sólido es tumorigénica; y
 - (v) la población de células madre de tumor sólido está enriquecida en relación a las células tumorales no fraccionadas; y
- (b) analizar la población de células respecto de patrones de expresión génica o de proteínas.

6. Un método *in vitro* para determinar el efecto de un compuesto de ensayo en una célula madre de tumor sólido, que comprende las etapas de:

- (a) obtener una población enriquecida de células madre de tumor sólido, en el que:

- (i) las células tumorales proceden de un tumor sólido de cáncer epitelial;
 (ii) la célula madre de tumor sólido expresa el marcador de la superficie celular CD44;
 (iii) la célula madre de tumor sólido expresa niveles menores del marcador CD24 que la expresión media de CD24 por células cancerosas no tumorigénicas procedentes del tumor sólido;
 5 (iv) la célula madre de tumor sólido es tumorigénica; y
 (v) la población de células madre de tumor sólido está enriquecida en relación a las células tumorales no fraccionadas;
- (b) poner en contacto las células obtenidas con el compuesto de ensayo; y
 10 (c) determinar la respuesta de las células puestas en contacto con el compuesto de ensayo.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el efecto del compuesto de ensayo se identifica basándose en una diferencia significativa en relación a cultivos de control respecto a las proporciones de fenotipos expresados, la viabilidad celular, la velocidad de proliferación, el número de células madre tumorales, la actividad de las células madre tumorales tras su trasplante *in vivo*, la actividad de las células madre tumorales tras su trasplante en cultivo, la distribución del ciclo celular de las células tumorales o alteraciones en la expresión génica.
 15
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que comprende determinar el efecto del compuesto de ensayo en la capacidad proliferativa de las células madre de tumor sólido.
 20
9. Un método *in vitro* para seleccionar un compuesto de ensayo que se une específicamente a una célula madre de tumor sólido, que comprende las etapas de:
- (a) obtener una población enriquecida de células madre de tumor sólido, en la que
 25 (i) las células tumorales proceden de un tumor sólido de cáncer epitelial;
 (ii) la célula madre de tumor sólido expresa el marcador de la superficie celular CD44;
 (iii) la célula madre de tumor sólido expresa niveles menores del marcador CD24 que la expresión media de CD24 por células cancerosas no tumorigénicas procedentes del tumor sólido;
 30 (iv) la célula madre de tumor sólido es tumorigénica; y
 (v) la población de células madre de tumor sólido está enriquecida en relación a las células tumorales no fraccionadas;
- (b) poner en contacto la población enriquecida de células madre de tumor sólido con un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas para permitir la formación de complejos; y
 35 (c) determinar la formación de complejos entre el compuesto de ensayo y la célula madre de tumor sólido, en el que la presencia del complejo identifica que el compuesto de ensayo se une específicamente a la célula madre tumoral.
- 40 10. Un método para diagnosticar la presencia de células madre de tumor sólido, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto células obtenidas de un tumor sólido de cáncer epitelial con un reactivo que se une a CD44 y un reactivo que se une al marcador negativo CD24; y
 (b) detectar el contacto entre el reactivo que se une a CD44 y las células del tumor sólido y no detectar contacto
 45 entre el reactivo que se une a CD24 y las células del tumor sólido, en donde una detección aumentada del número de células puestas en contacto en comparación con el número de células puestas en contacto en un tumor benigno identifica que el tumor contiene células madre de tumor sólido.
11. Un método *in vitro* para diagnosticar la presencia de células madre de tumor sólido en un paciente que tiene un tumor sólido de origen epitelial, que comprende las etapas de:
 50 (a) proporcionar una muestra obtenida del paciente,
 (b) poner en contacto las células de la muestra con un reactivo que se une a CD44 y un reactivo que se une al marcador negativo CD24; y
 55 (c) detectar el contacto entre el reactivo que se une a CD44 y las células de la muestra, y no detectar contacto entre el reactivo que se une a CD24, para identificar que la muestra contiene células madre de tumor sólido.
12. El método de la reivindicación 10 o de la reivindicación 11, en el que las células madre de tumor sólido se caracterizan adicionalmente por la expresión de antígeno específico epitelial (ESA).
 60
13. Un método *in vitro* para la proliferación de células madre tumorales, que comprende las etapas de:
- (a) obtener una población enriquecida de células madre de tumor sólido, en la que:
 65 (i) las células tumorales proceden de un tumor sólido de cáncer epitelial;
 (ii) la célula madre de tumor sólido expresa el marcador de la superficie celular CD44;

- (iii) la célula madre de tumor sólido expresa niveles menores del marcador CD24 que la expresión media de CD24 por células cancerosas no tumorigénicas procedentes del tumor sólido;
- (iv) la célula madre de tumor sólido es tumorigénica; y
- (v) la población de células madre de tumor sólido está enriquecida en relación a las células tumorales no fraccionadas; y

(b) proliferar las células obtenidas en un medio de cultivo.

14. Un método *in vitro* para producir células madre tumorales modificadas genéticamente, que comprende las etapas de:

(a) obtener una población enriquecida de células madre de tumor sólido, en la que:

- (i) las células tumorales proceden de un tumor sólido de cáncer epitelial;
- (ii) la célula madre de tumor sólido expresa el marcador de la superficie celular CD44;
- (iii) la célula madre de tumor sólido expresa niveles menores del marcador CD24 que la expresión media de CD24 por células cancerosas no tumorigénicas procedentes del tumor sólido;
- (iv) la célula madre de tumor sólido es tumorigénica; y
- (v) la población de células madre de tumor sólido está enriquecida en relación a las células tumorales no fraccionadas; y

(b) modificar genéticamente a las células obtenidas.

15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, o 3 a 14, o una célula madre de tumor sólido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho tumor sólido es un tumor sólido de cáncer de mama o un tumor sólido de ovario.

16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, o 3 a 14, o una célula madre de tumor sólido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha célula madre de tumor sólido expresa además B38.1 o antígeno específico epitelial (ESA), o no expresa niveles detectables de CD24, o no expresa niveles detectables de uno o más de los marcadores LINEAGE seleccionados del grupo que consiste en CD2, CD3, CD10, CD14, CD16, CD31, CD45, CD64 y CD140b.

17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 9, 13 o 14, o una célula madre de tumor sólido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha población está enriquecida en al menos 5 veces.

18. Un método o una célula madre de tumor sólido para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha población está enriquecida en al menos 50 veces.

19. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 9, 13 o 14 o una célula madre de tumor sólido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha población comprende al menos un 75 % de células madre de tumor sólido y menos de un 25 % de células de tumor sólido.

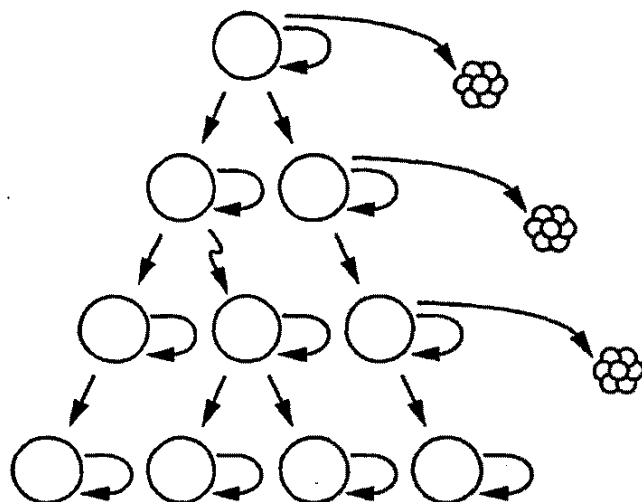


FIG. 1A

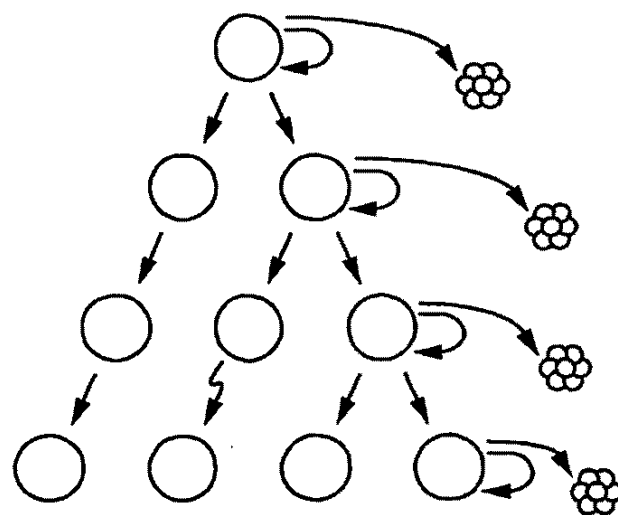
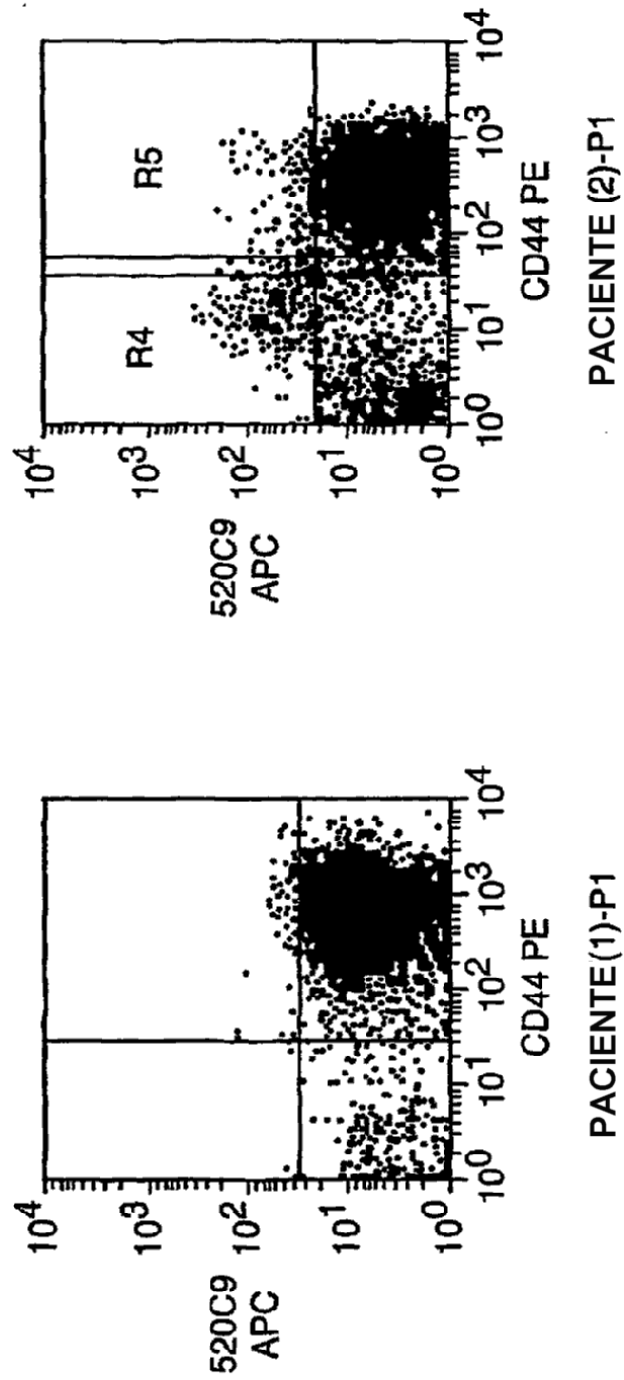


FIG. 1B



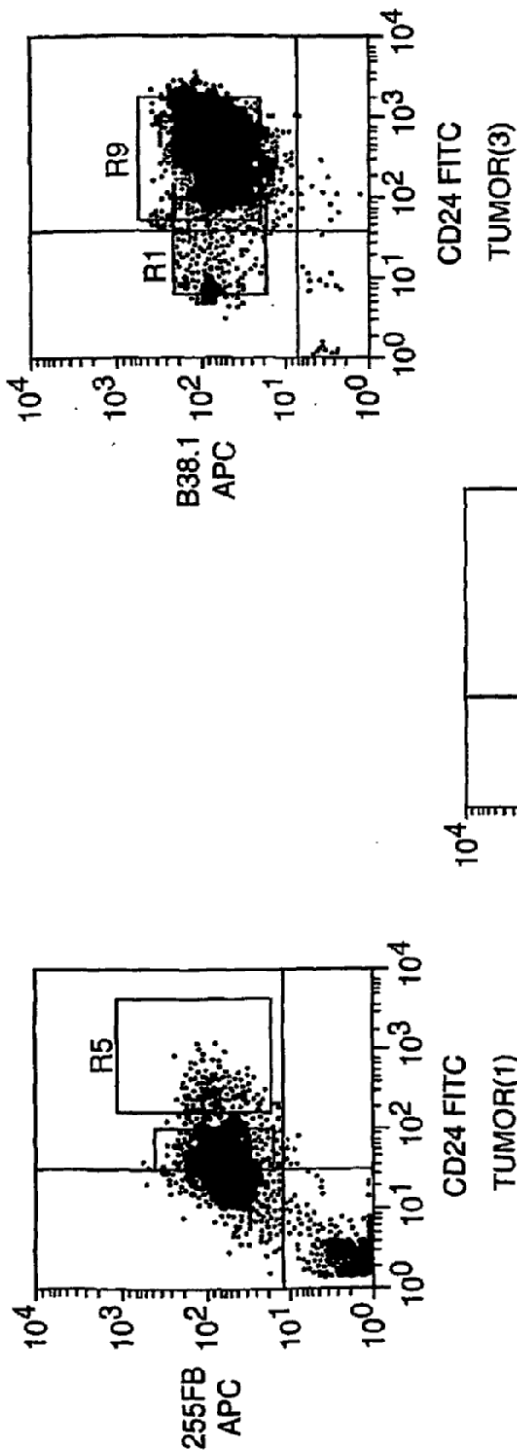


FIG. 3A

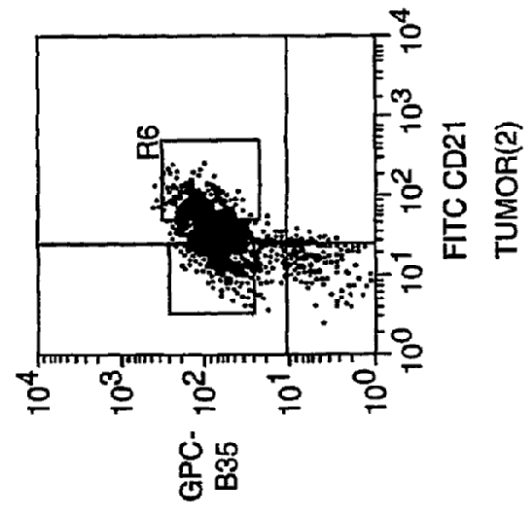


FIG. 3B

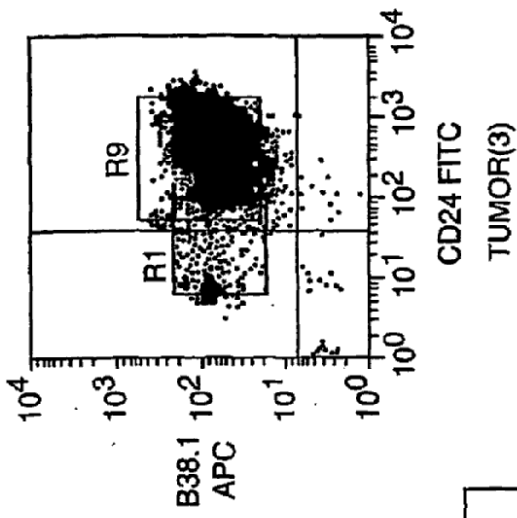


FIG. 3C

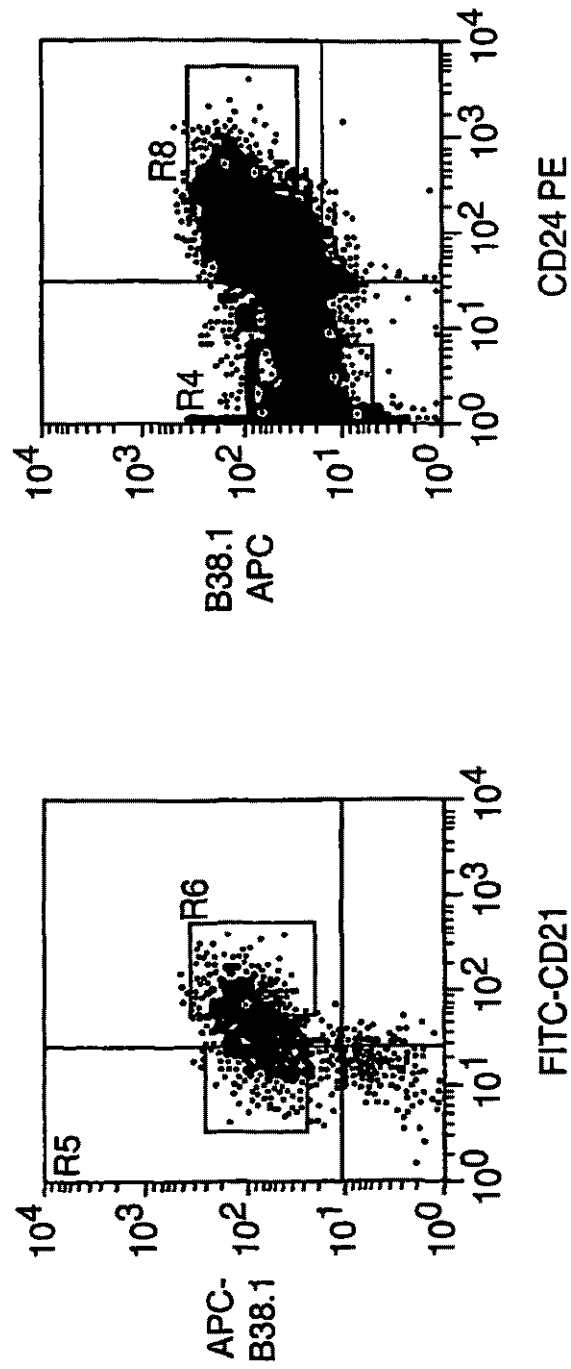


FIG. 4A

FIG. 4B

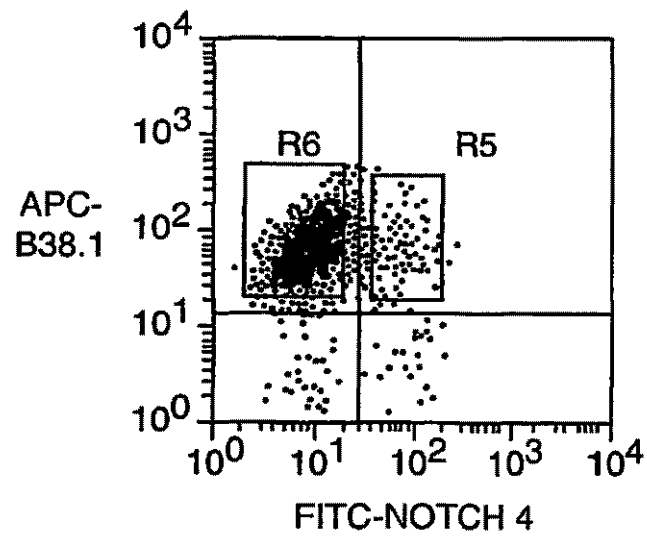


FIG. 5

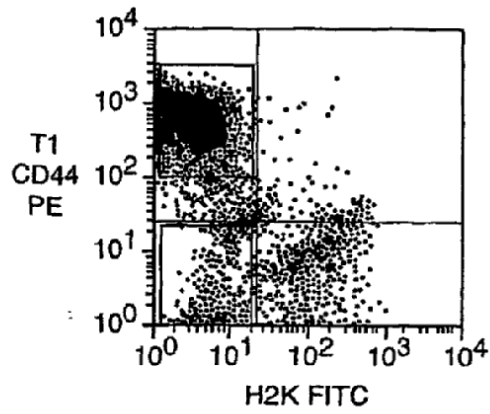


FIG. 6A

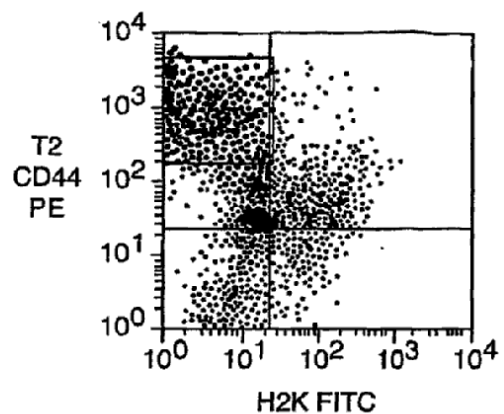


FIG. 6B

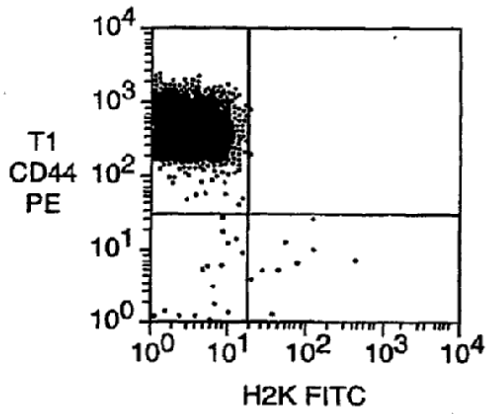


FIG. 6C

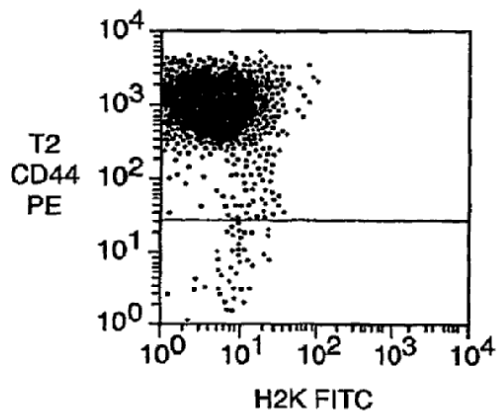


FIG. 6D

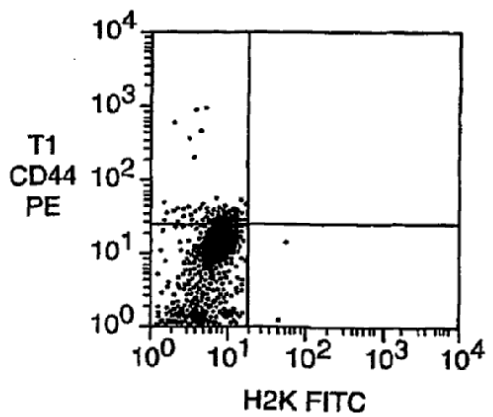


FIG. 6E

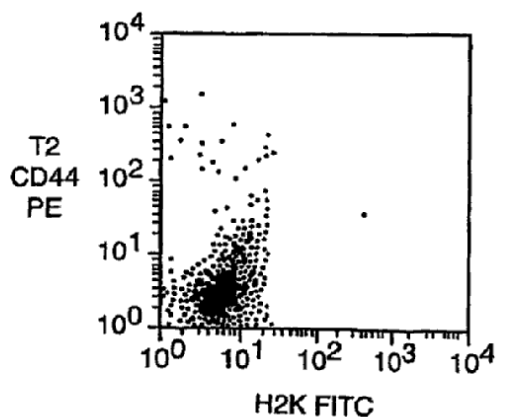


FIG. 6F

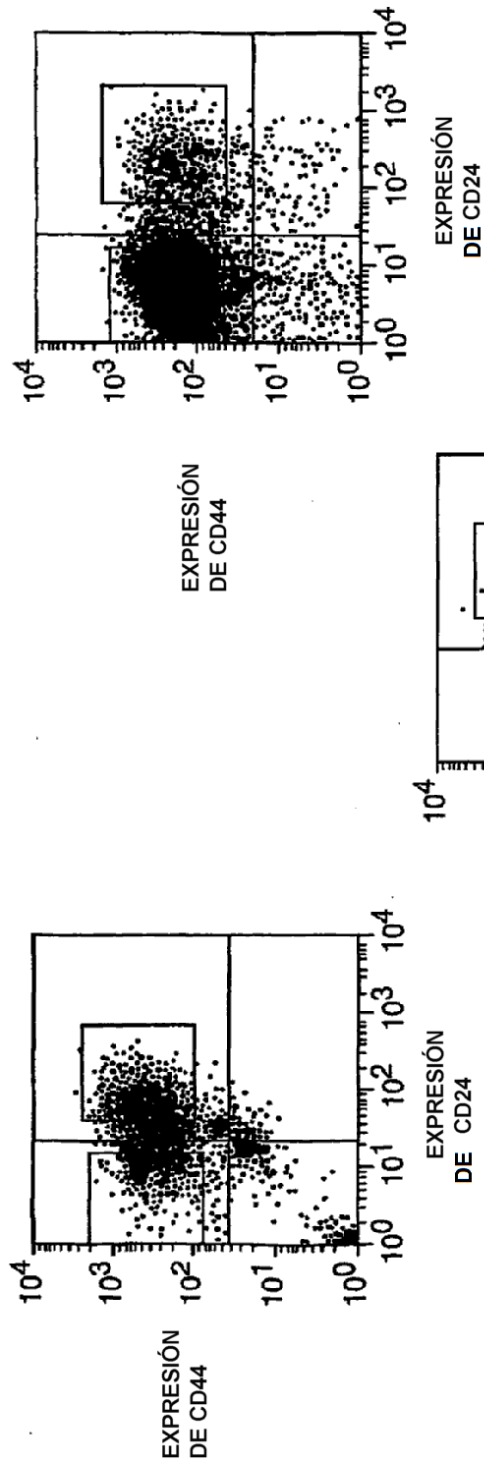


FIG. 7A

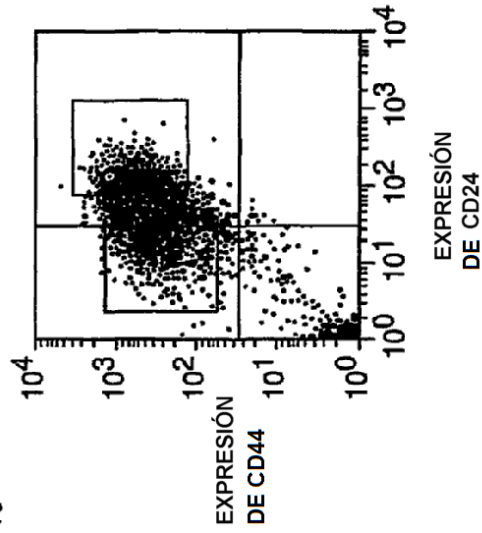


FIG. 7B

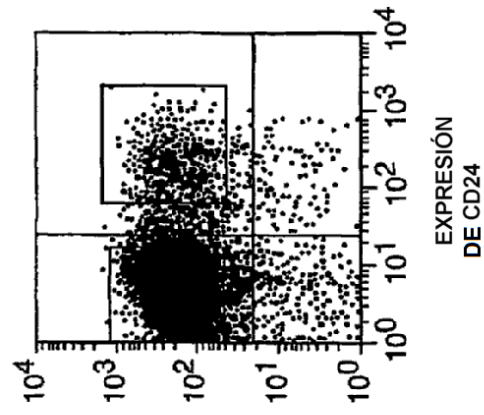
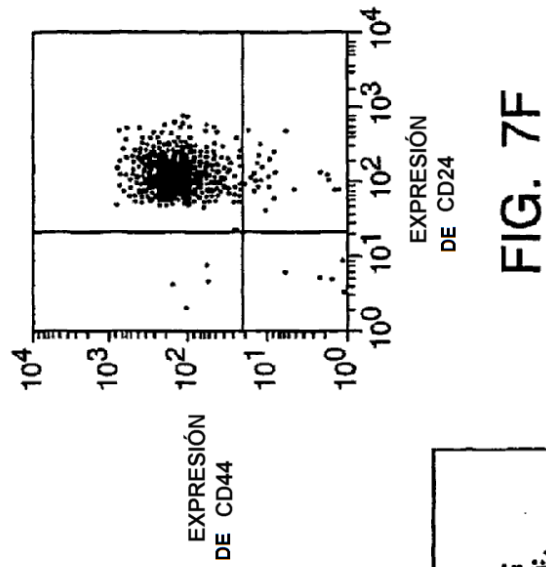
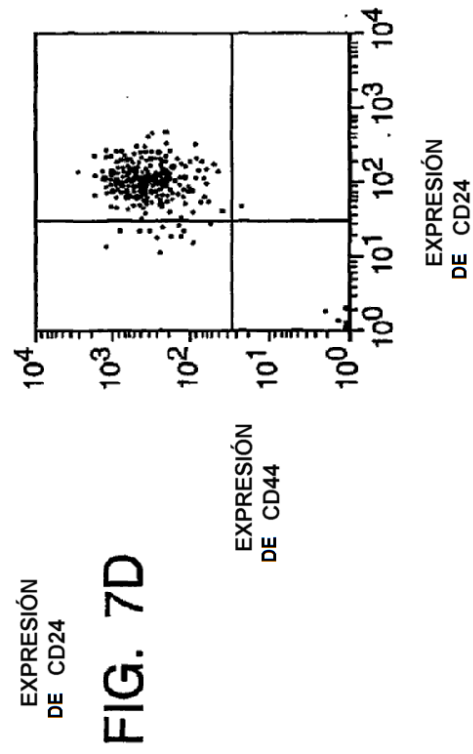
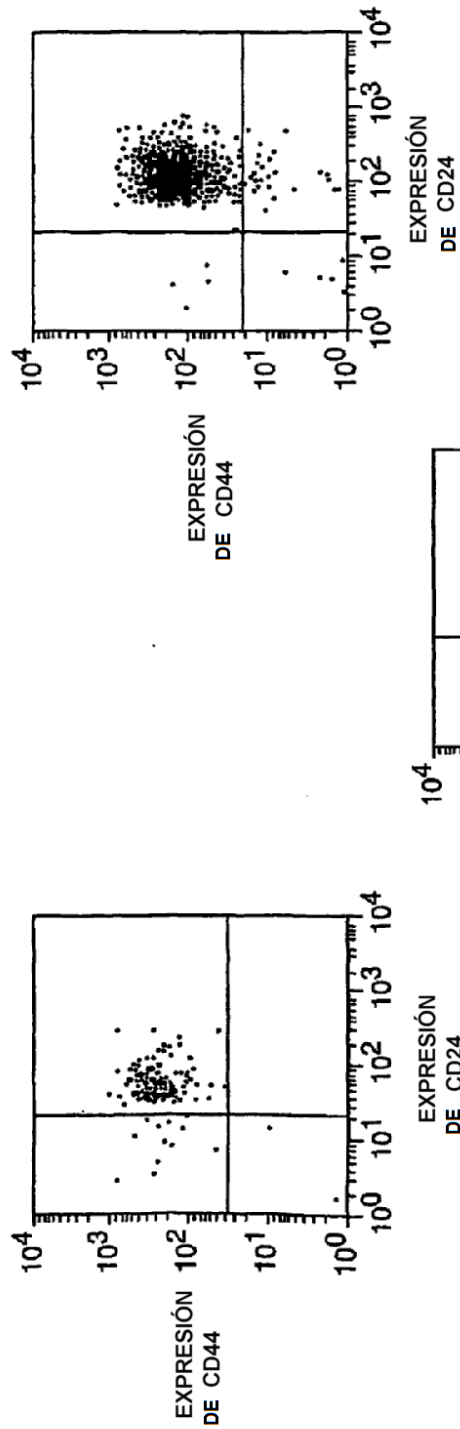


FIG. 7C



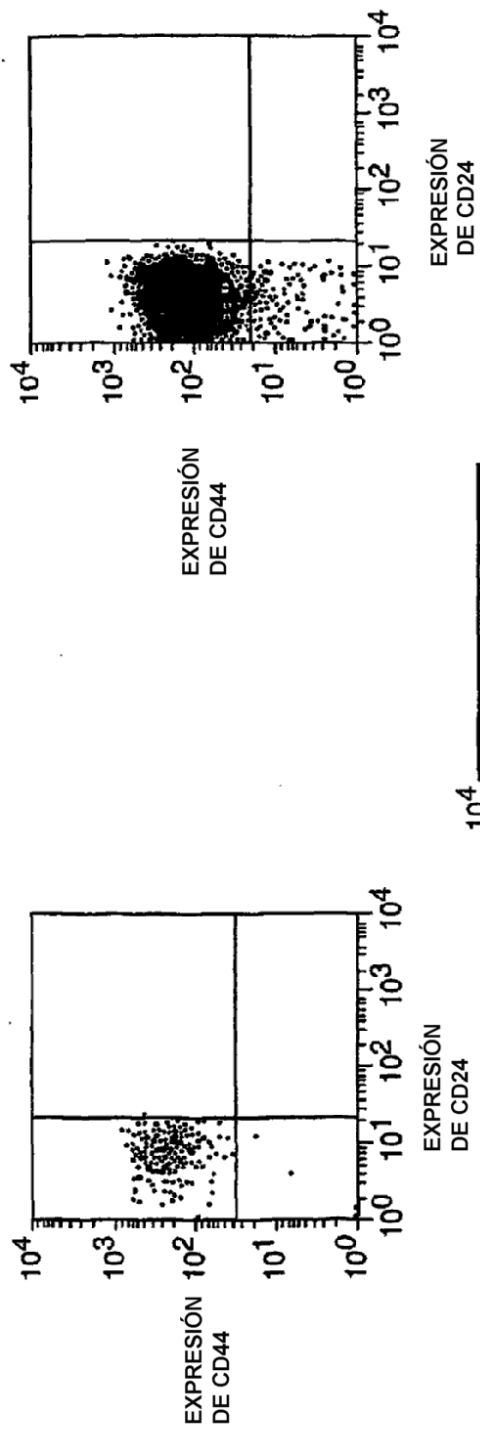


FIG. 7I

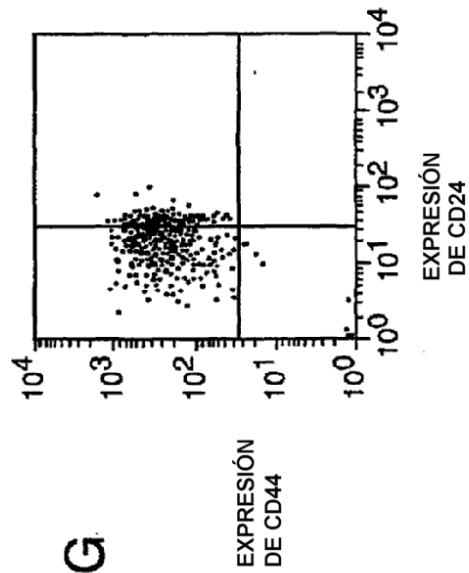


FIG. 7H

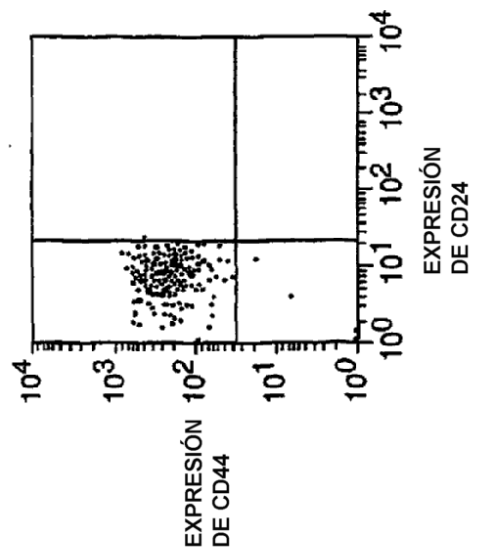


FIG. 7G



FIG.7J



FIG.7K

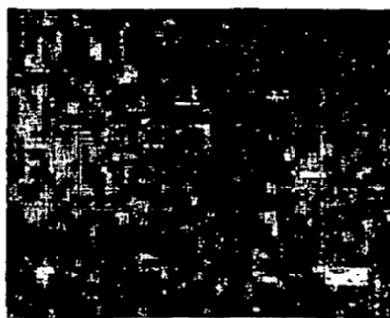


FIG.7L

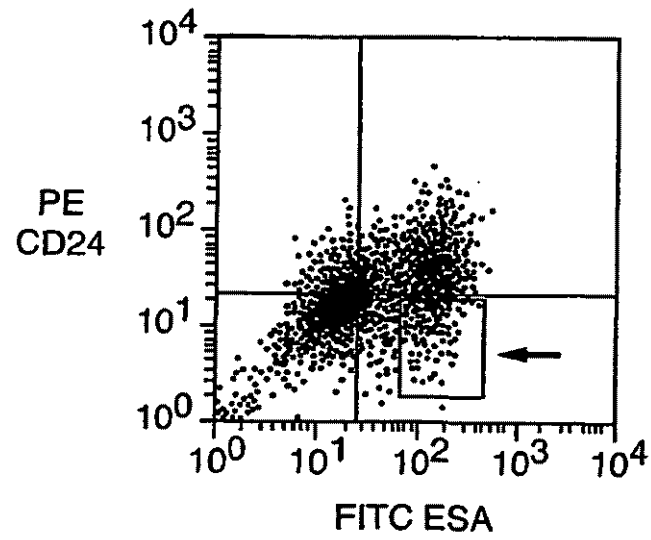
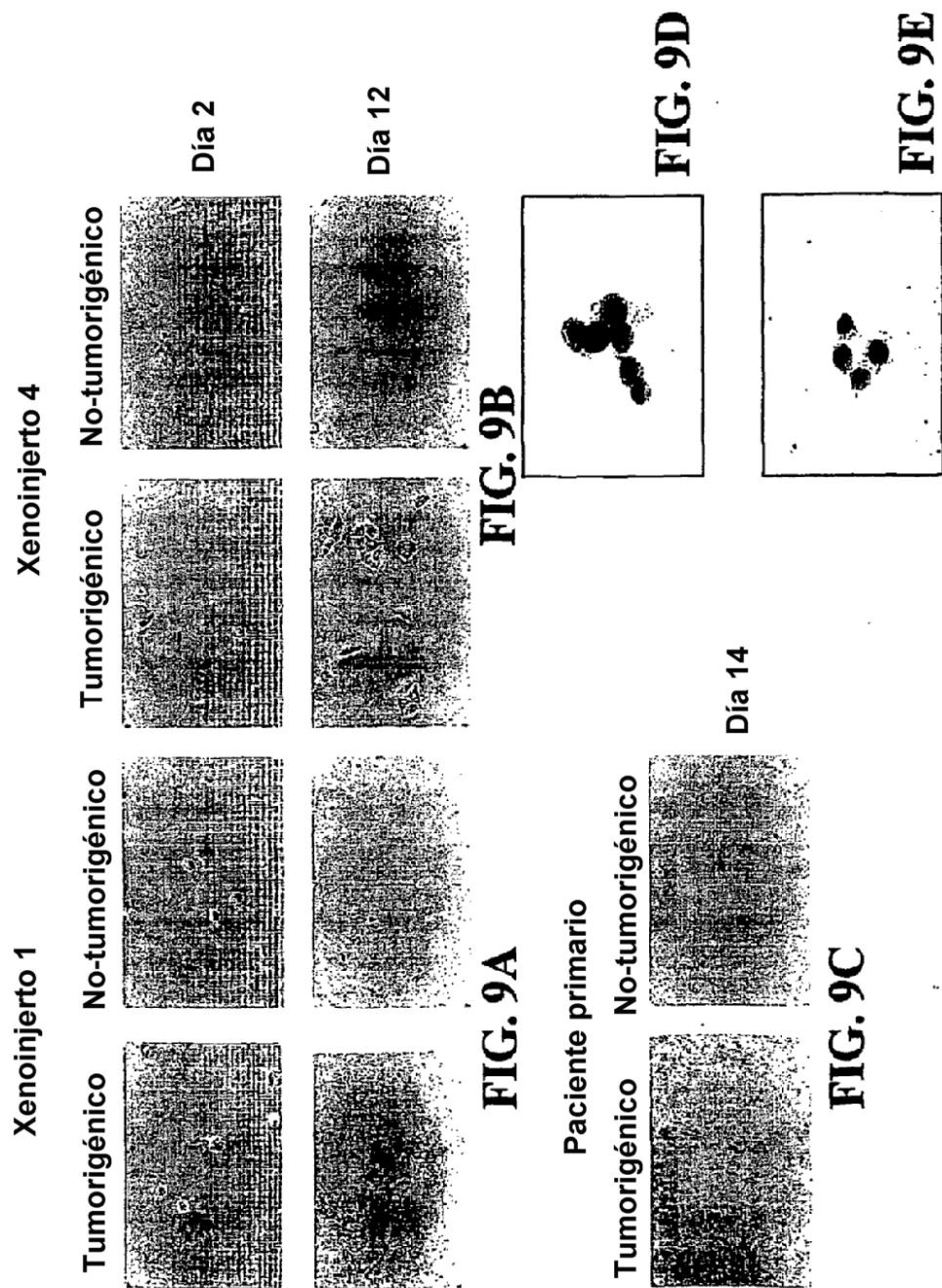


FIG. 8



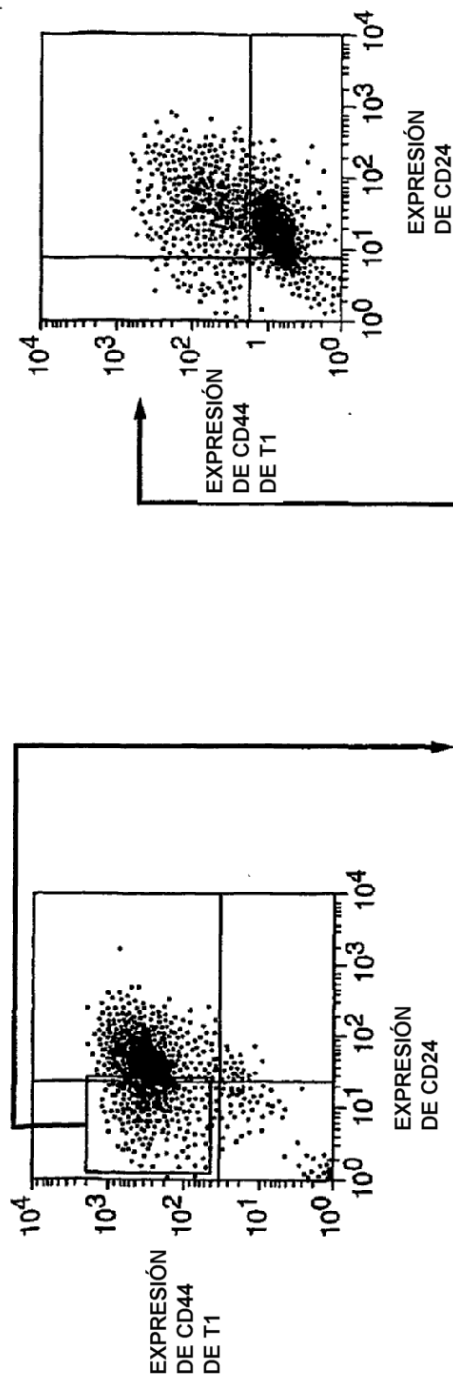


FIG. 10A

FIG. 10C

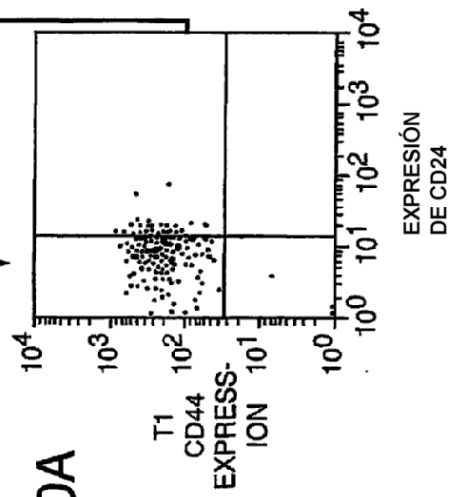


FIG. 10B

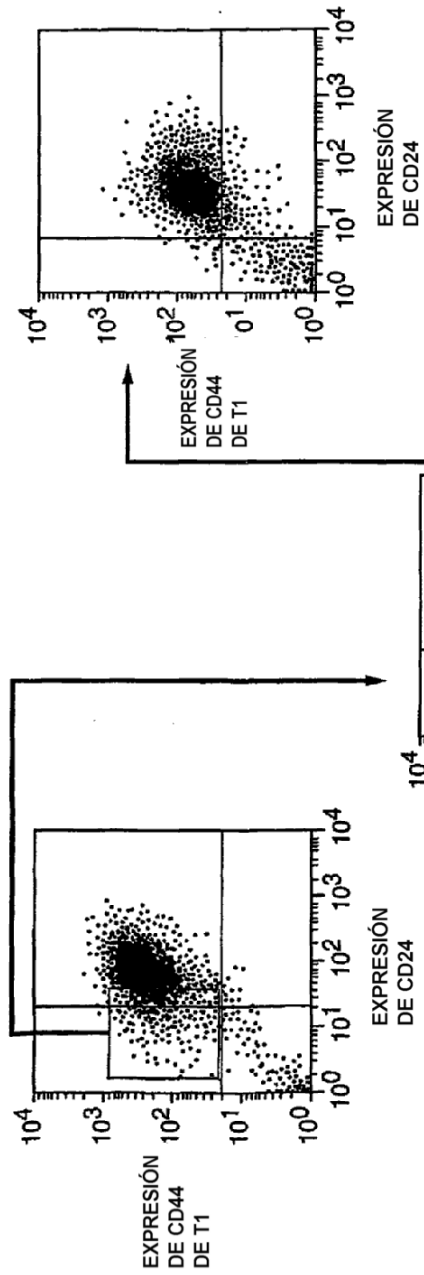


FIG. 10D

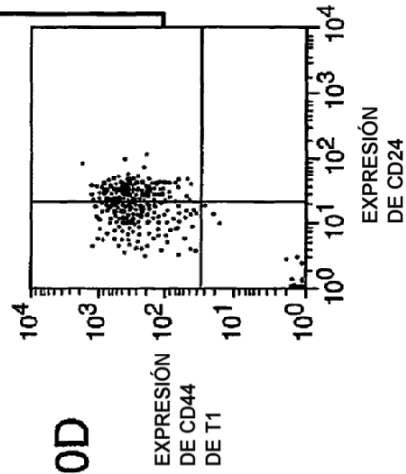


FIG. 10E

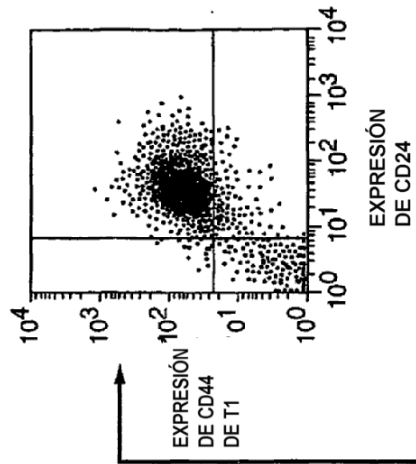


FIG. 10F

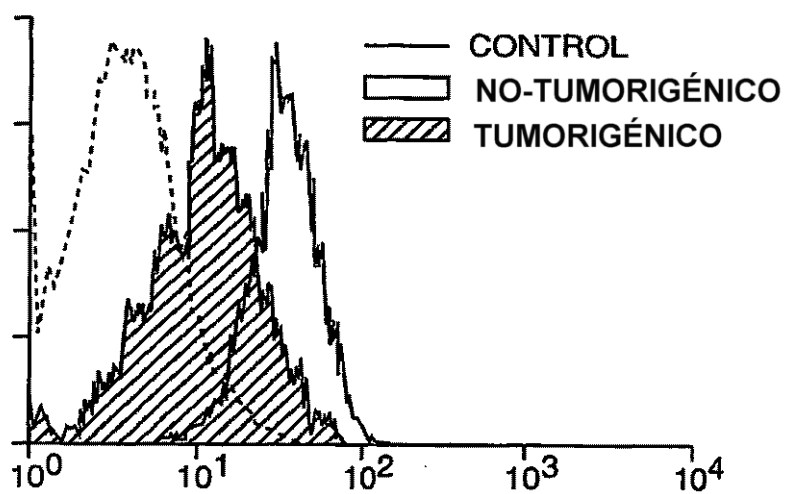


FIG. 11A

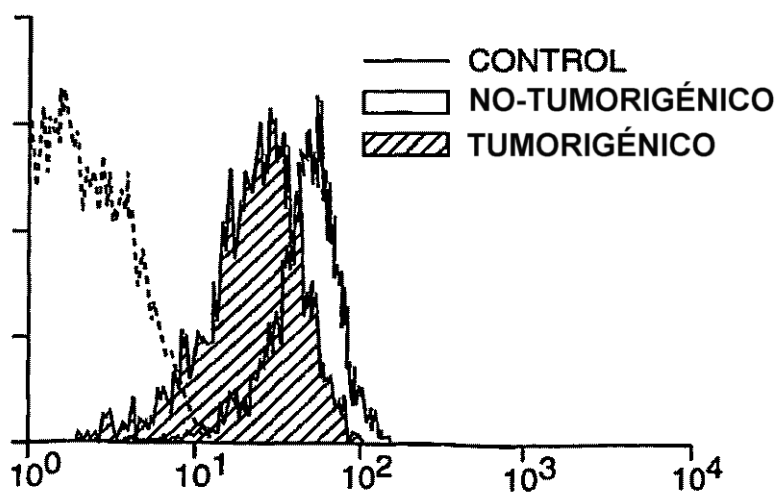
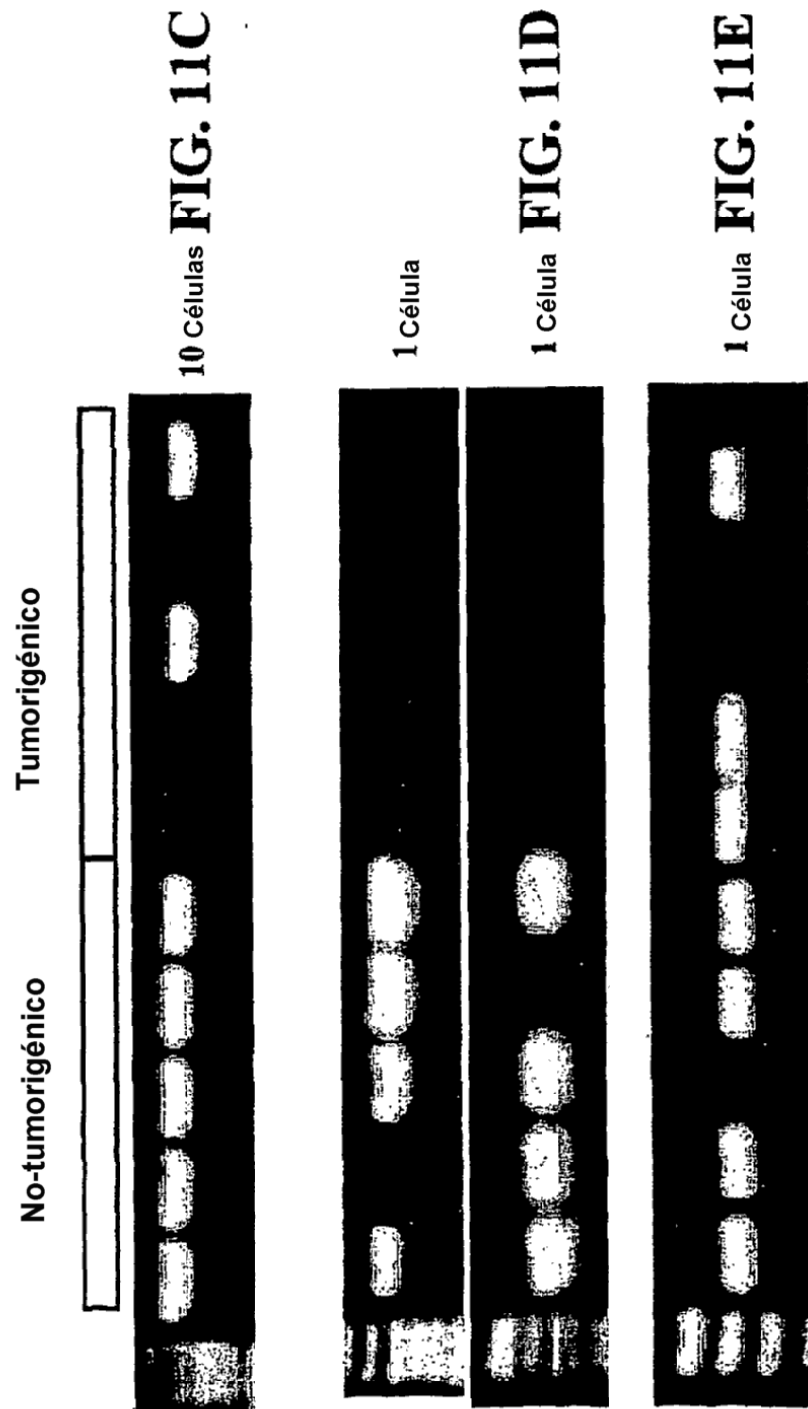


FIG. 11B



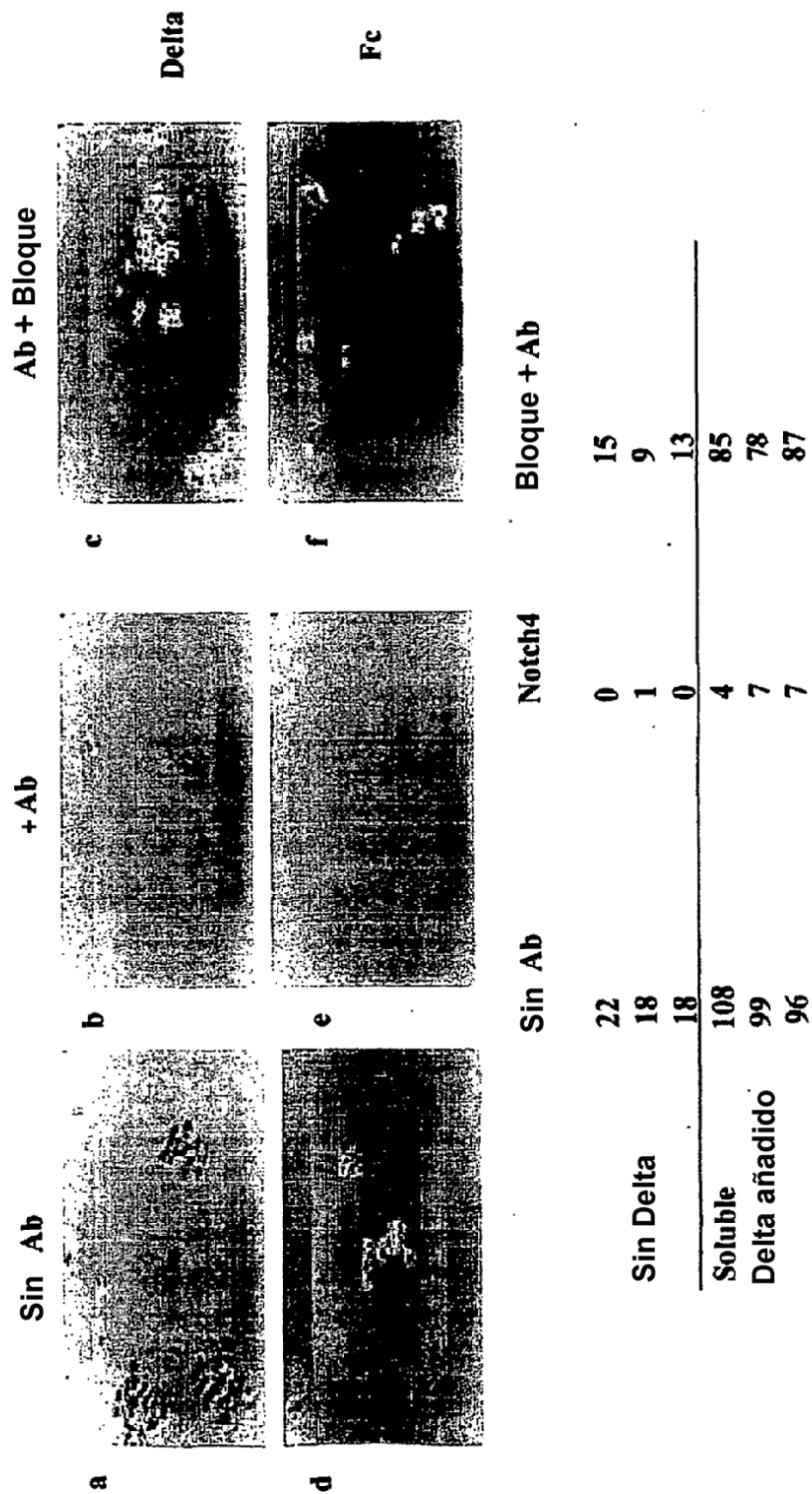
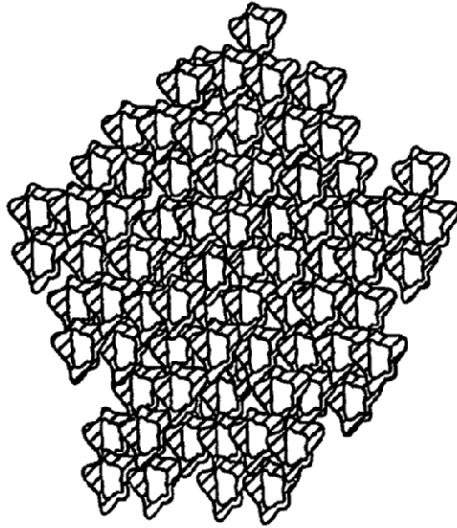
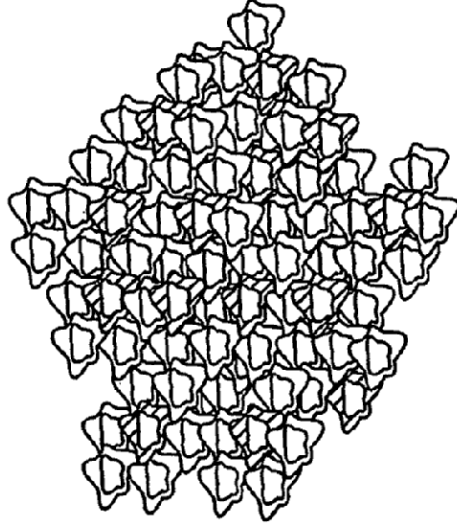


FIG. 12

USO DE ANTICUERPO B38.1 PARA DIRIGIR LA INFECCIÓN DE
ADENOVIRUS A CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TUMORIGÉNICAS



TODAS LAS CÉLULAS TUMORIGÉNICAS
SE DIRIGEN AL TUMOR



LAS CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA
SE DIRIGEN A UNA SUBPOBLACIÓN DE
CÉLULAS

FIG. 13

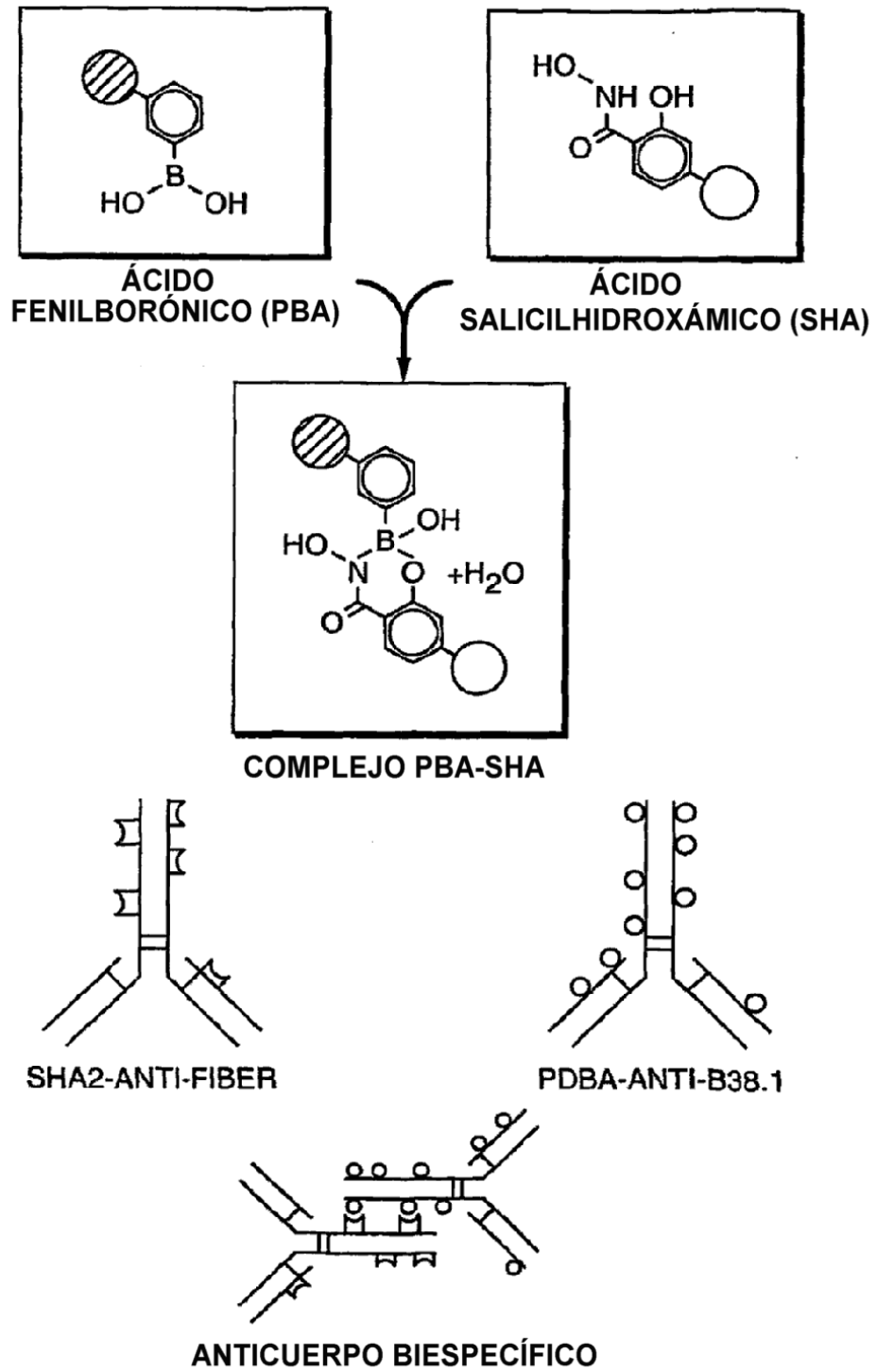


FIG. 14

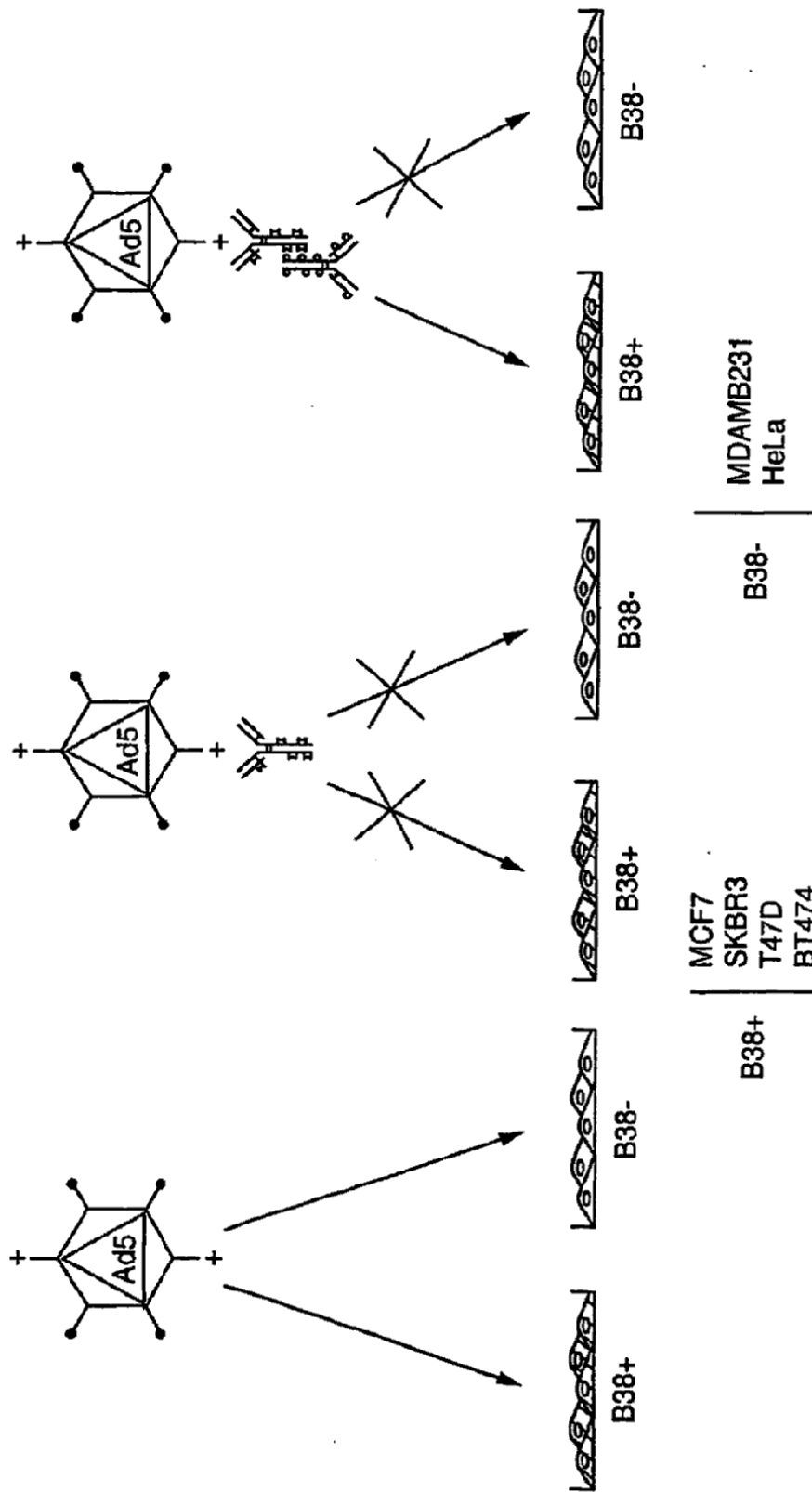


FIG. 15

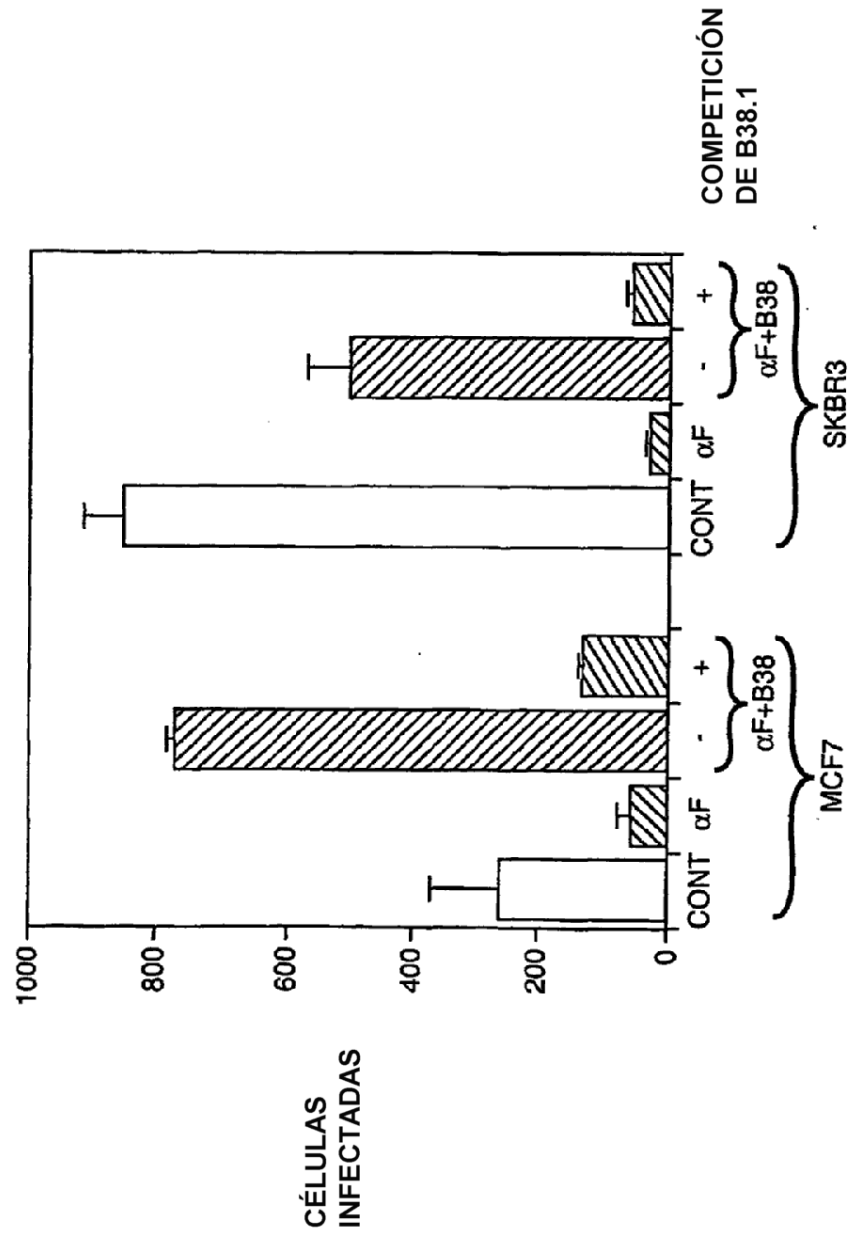


FIG. 16

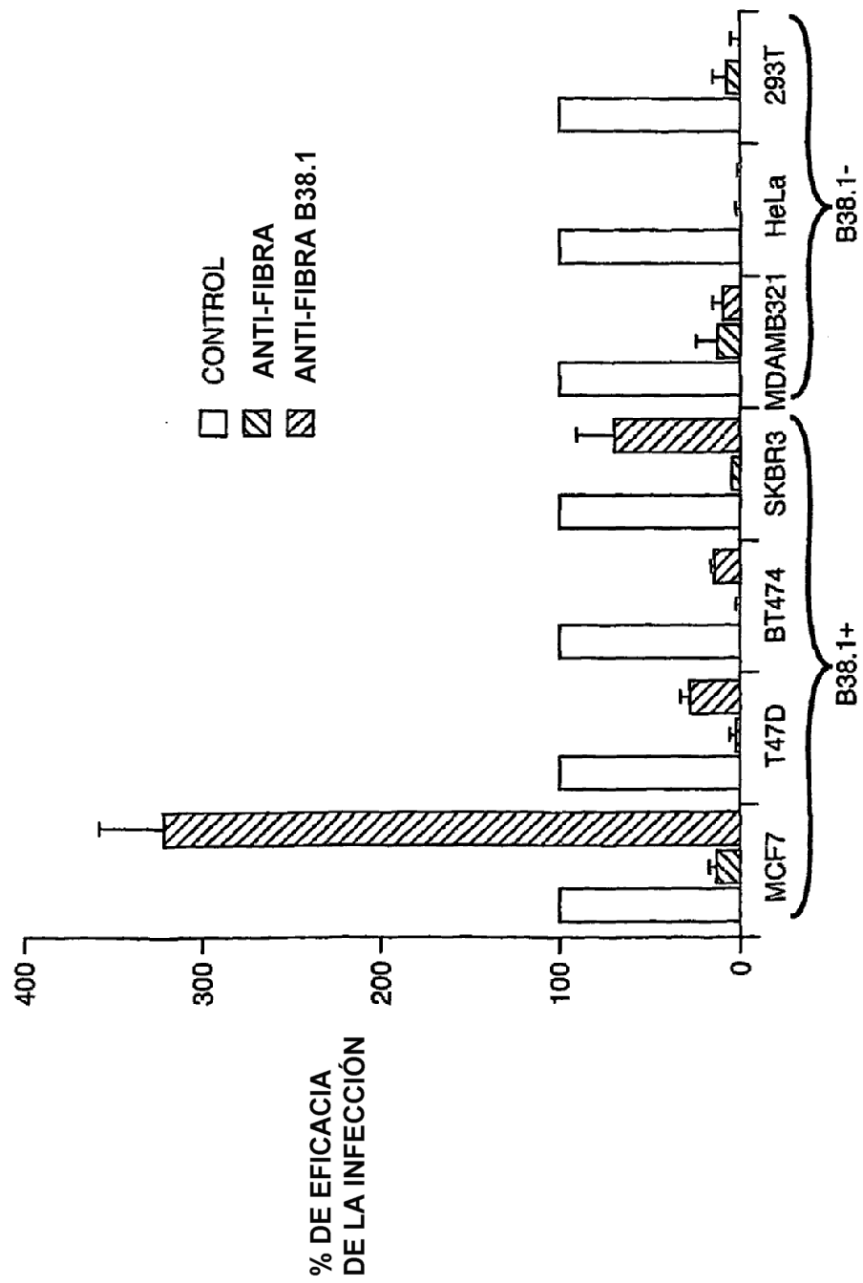


FIG. 17

DIRECCIONAMIENTO ESPECÍFICO DE ADENOVIRUS A CÉLULAS DE CÁNCER
DE MAMA QUE EXPRESAN B38.1

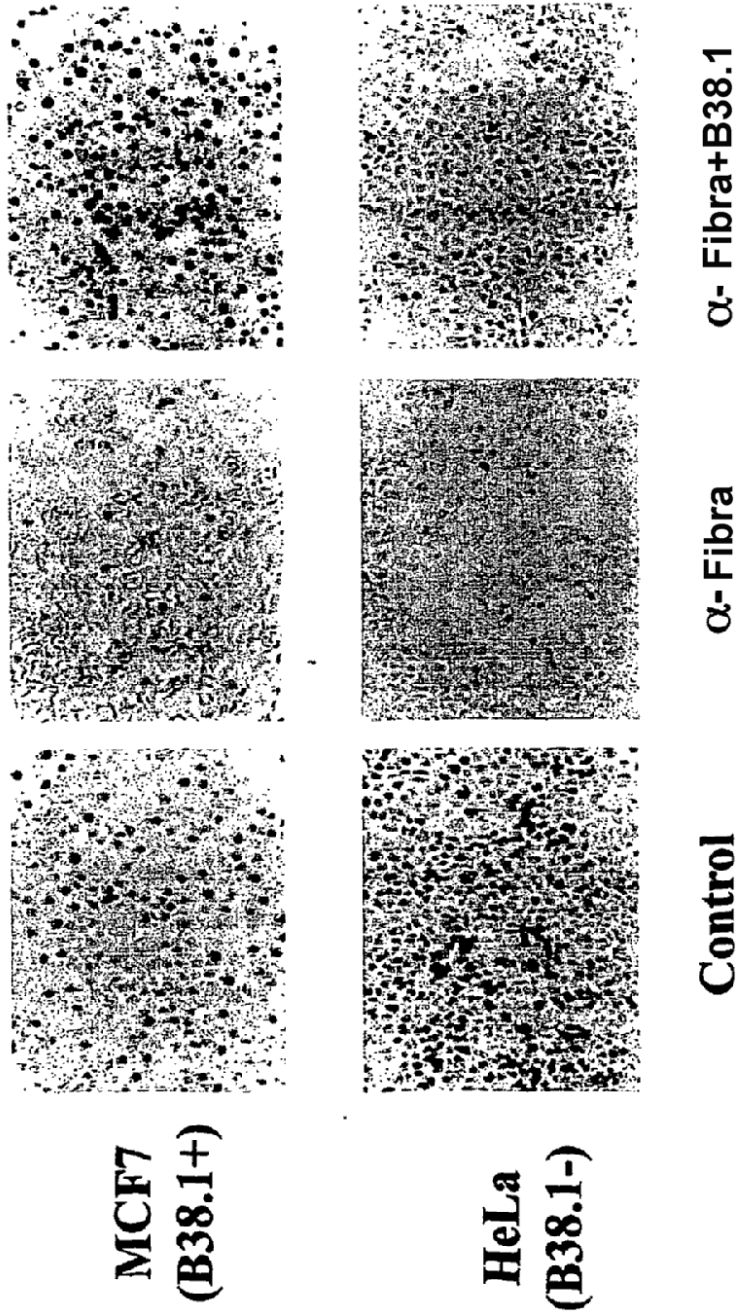


FIG. 18

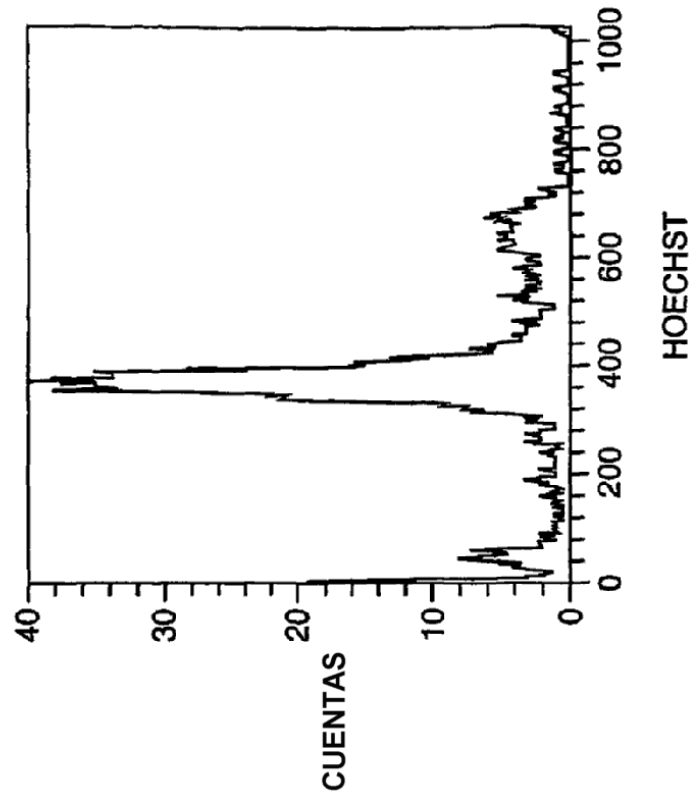


FIG. 19A

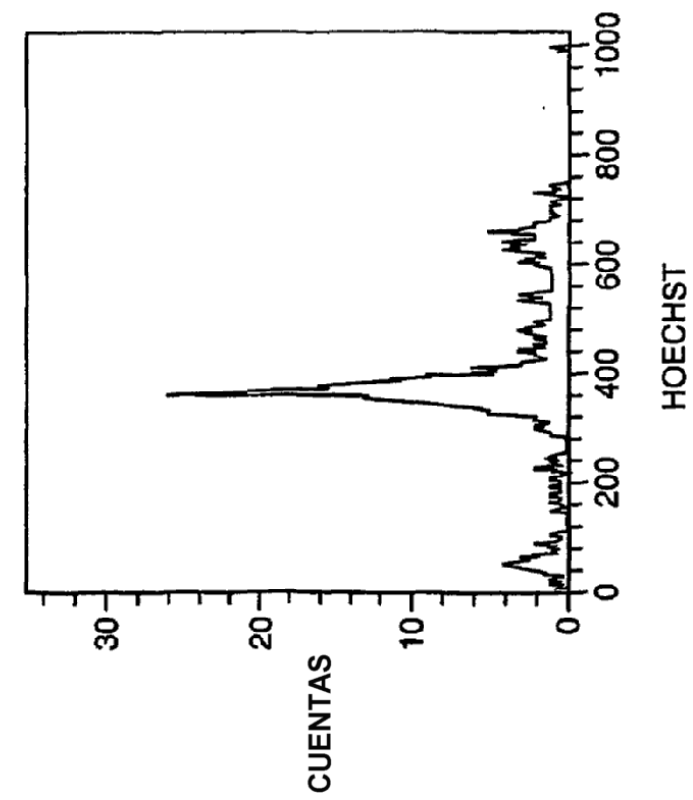


FIG. 19B

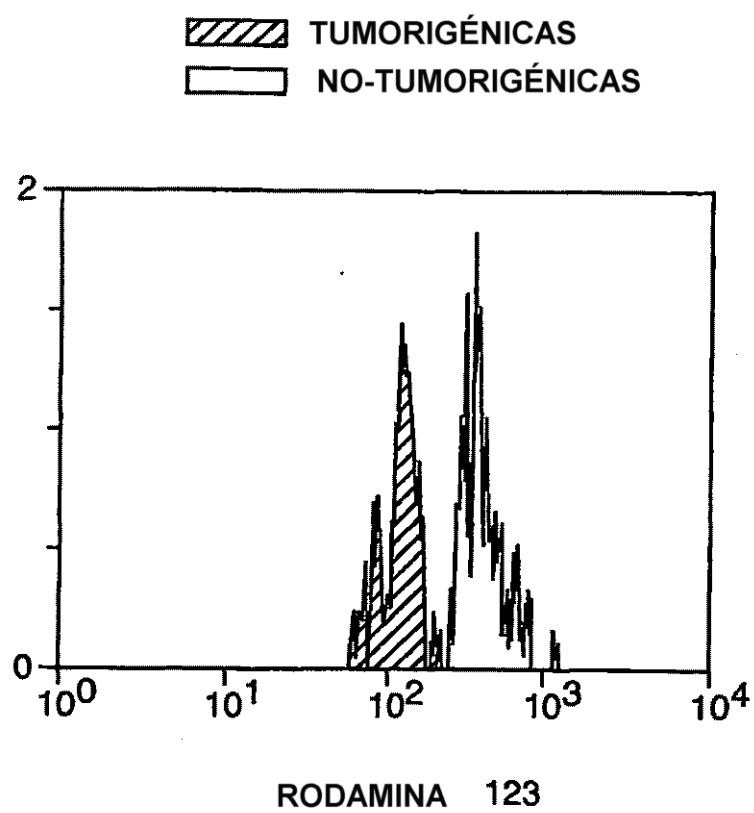


FIG. 20

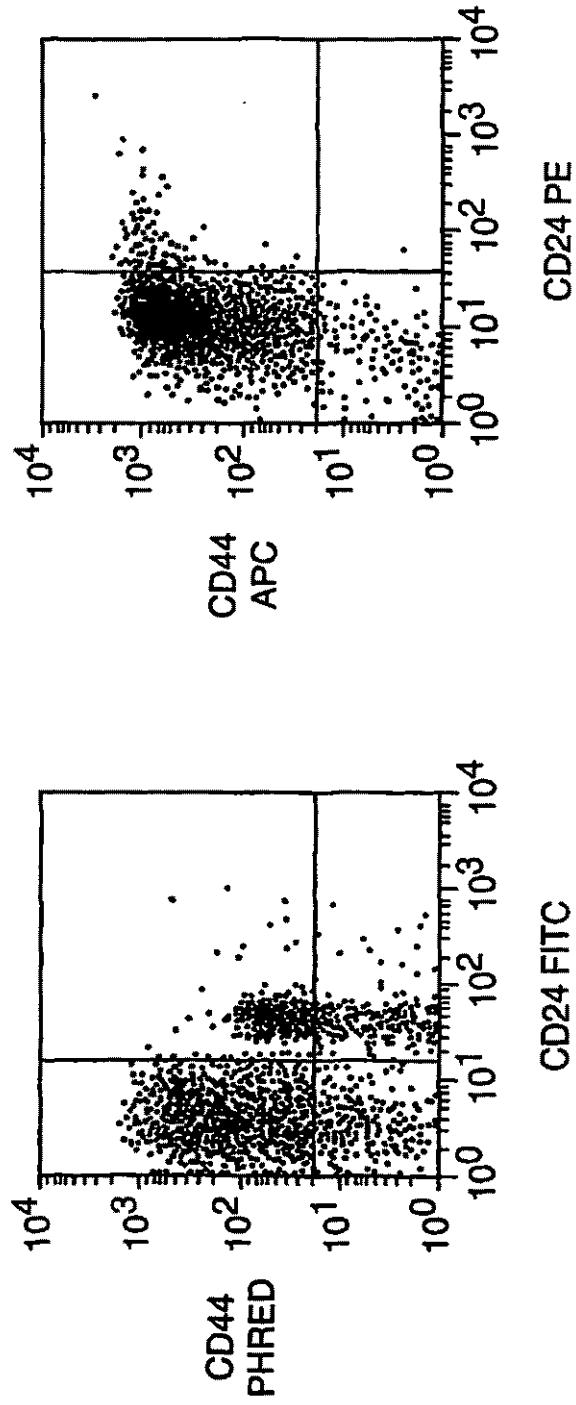


FIG. 21

FIG. 22