



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 988 620**

⑫ Int. Cl.:

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

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2009 E 22191296 (7)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 4160212**

⑭ Título: **Marcadores de las células madre de la leucemia mieloide aguda**

⑯ Prioridad:

15.01.2008 US 11324 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2024

⑭ Titular/es:

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

⑯ Inventor/es:

WEISSMAN, IRVING, L y MAJETI, RAVINDRA

⑯ Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 988 620 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Marcadores de las células madre de la leucemia mieloide aguda

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] La investigación básica del cáncer se ha centrado en identificar los cambios genéticos que conducen al cáncer. Ello ha permitido importantes avances en nuestra comprensión de las vías moleculares y bioquímicas que intervienen en la tumorigénesis y la transformación maligna. Sin embargo, nuestra comprensión de la biología celular se ha quedado atrás. Aunque pueden predecirse los efectos de determinadas mutaciones en la proliferación y supervivencia de células modelo, como fibroblastos o líneas celulares, los efectos de tales mutaciones en las células reales implicadas en cánceres específicos son, en gran medida, conjeturas.

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

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

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

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

[0006] En apoyo de esta hipótesis, estudios recientes han demostrado que, de forma similar a la leucemia y otras neoplasias hematológicas, las poblaciones tumorigénicas y no tumorigénicas de células de cáncer de mama pueden aislarse en función de su expresión de marcadores de superficie celular. En muchos casos de cáncer de mama, sólo una pequeña subpoblación de células tenía capacidad para formar nuevos tumores. Este trabajo apoya firmemente la existencia de CSC en el cáncer de mama. En las neoplasias malignas del sistema nervioso central (CNS) se han encontrado más pruebas de la existencia de células madre cancerosas en los tumores sólidos. Utilizando técnicas de cultivo similares a las empleadas para cultivar células madre neuronales normales se ha demostrado que las neoplasias neuronales del CNS contienen una pequeña población de células cancerosas que son clonogénicas *in vitro* e inicián tumores *in vivo*, mientras que el resto de células del tumor no tienen estas propiedades.

[0007] Las células madre se definen como células que tienen la capacidad de perpetuarse a través de la autorrenovación y de generar células maduras de un tejido particular a través de la diferenciación. En la mayoría de los tejidos, las células madre son escasas. En consecuencia, las células madre deben identificarse de forma prospectiva y purificarse cuidadosamente para estudiar sus propiedades. Quizá la propiedad más importante y útil de las células madre sea la de autorrenovación. Gracias a esta propiedad, se pueden encontrar sorprendentes paralelismos entre las células madre y las células cancerosas: los tumores pueden originarse a menudo a partir de la transformación de células madre normales, vías de señalización similares pueden regular la autorrenovación en células madre y células cancerosas, y los cánceres pueden comprender células raras con un potencial indefinido de autorrenovación que impulsan la tumorigénesis.

5 [0008] La presencia de células madre cancerígenas tiene profundas implicaciones para la terapia del cáncer. En la actualidad, todas las células cancerosas fenotípicamente diversas de un tumor se tratan como si tuvieran un potencial proliferativo ilimitado y pudieran adquirir la capacidad de metastatizar. Sin embargo, durante muchos años se ha reconocido que pueden detectarse pequeñas cantidades de células cancerosas diseminadas en lugares distantes de los tumores primarios en pacientes que nunca manifiestan enfermedad metastásica. Una posibilidad es que la vigilancia inmunitaria sea muy eficaz para eliminar las células cancerosas diseminadas antes de que puedan formar un tumor detectable. Otra posibilidad es que la mayoría de las células cancerosas carezcan de la capacidad de formar un nuevo tumor, de modo que sólo la diseminación de células madre cancerosas poco frecuentes puede conducir a la enfermedad metastásica. Si es así, el objetivo de la terapia debe ser identificar y eliminar esta población de células madre cancerosas.

10 [0009] La identificación y el aislamiento prospectivos de las células madre cancerosas permitirán una identificación más eficaz de los marcadores de diagnóstico y de las dianas terapéuticas expresadas por las células madre. Las terapias existentes se han desarrollado en gran medida contra la población masiva de células tumorales, ya que las terapias se identifican por su capacidad para reducir la masa tumoral. Sin embargo, dado que la mayoría de las células de un cáncer tienen un potencial proliferativo limitado, la capacidad de reducir el tamaño de un tumor refleja principalmente la capacidad de eliminar estas células. Las terapias dirigidas más específicamente contra las células madre del cáncer pueden dar lugar a respuestas más duraderas y a la curación de tumores metastásicos.

15 [0010] La hematopoyesis procede a través de una jerarquía de desarrollo organizada iniciada por las células madre hematopoyéticas (HSC) que dan lugar a progenitores progresivamente más comprometidos y, finalmente, a células sanguíneas terminalmente diferenciadas (Bryder et al., 2006). Aunque el concepto de HSC no era nuevo, no fue hasta 1988 cuando se demostró que esta población podía aislarse prospectivamente de la médula ósea de ratones basándose en marcadores de superficie celular mediante la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Spangrude et al., 25 1988). Desde entonces, el inmunofenotipo de superficie de las HSC de ratón se ha ido refinando cada vez más, de forma que las HSC funcionales pueden aislarse con una sensibilidad exquisita, lo que da como resultado una pureza de 1 en 1,3 células (Kiel et al., 2005). Mientras que nuestra capacidad para aislar prospectivamente las HSC de ratón ha mejorado espectacularmente en los últimos 20 años, nuestra comprensión de los acontecimientos más tempranos en el sistema hematopoyético humano va muy a la zaga.

20 [0011] Las células madre cancerosas se analizan, por ejemplo, en Pardal et al. (2003) *Nat Rev Cancer* 3, 895-902; Reya et al. (2001) *Nature* 414, 105-11; Bonnet & Dick (1997) *Nat Med* 3, 730-7; Al-Hajj et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-8; Dontu et al. (2004) *Breast Cancer Res* 6, R605-15; Singh et al. (2004) *Nature* 432, 396-401.

25 [0012] El documento US 2004/213792 describe un método para inhibir la activación celular por el factor de crecimiento-1 similar a la insulina. Jamieson et al. (2005) *American Society of Hematology* 106:911A informa de que el aumento de la expresión de CD47 es un marcador constante en las leucemias mieloídes humanas y de ratón. Gardai et al. (2005) *Cell* 123:321-334 informa de que la calreticulina de la superficie celular inicia la eliminación de células apoptóticas viables mediante la transactivación de la PRL en el fagocito. Oldenborg et al. (2001) *The Journal of Experimental Medicine* 193(7):855-861 informa de que CD47-SIRPa regula la fagocitosis mediada por Fc-gamma y el receptor del complemento.

30 [0013] La identificación de una jerarquía de progenitores hematopoyéticos multipotentes en la sangre del cordón umbilical humano, incluidas las células progenitoras multipotentes, puede encontrarse en Majeti et al. (2007) *Cell Stem Cell* 1(6):635-45, que describe marcadores que identifican a los progenitores multipotentes.

45 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0014] La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

50 [0015] Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

55 [0016] La invención proporciona un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 que bloquea la interacción de CD47 con SIRPa, para su uso en el tratamiento de una afección preleucémica mediante la inhibición del injerto de células madre leucémicas (LSC) de AML, en el que el bloqueo de la interacción de CD47 con SIRPa estimula la fagocitosis de LSC de AML por macrófagos. En algunas realizaciones, la afección preleucémica es un síndrome mielodisplásico (SMD) o un trastorno mieloproliferativo (TMP).

60 [0017] En el presente documento se describen marcadores de células madre de leucemia mieloide aguda (AMLSC). Los marcadores son polinucleótidos o polipéptidos que se expresan diferencialmente en las AMLSC en comparación con las células homólogas normales. Los usos de los marcadores incluyen su utilización como dianas para anticuerpos o ligandos terapéuticos; como dianas para el desarrollo de fármacos, y para la identificación o selección de poblaciones de células AMLSC.

65 [0018] Los marcadores AMLSC son útiles como dianas de anticuerpos monoclonales terapéuticos para el tratamiento de

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

5 [0019] En algunos aspectos, las combinaciones de anticuerpos monoclonales se utilizan en el tratamiento de afecciones preleucémicas. En una realización, un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47, por ejemplo un anticuerpo que bloquea la interacción de CD47 con SIRPa, se combina con anticuerpos monoclonales dirigidos contra uno o más marcadores adicionales de AMLSC, p. ej., CD96, CD97, CD99, CD180, PTHR2, HAVCR2 (también denominado TIM3), y similares, cuyas composiciones pueden ser sinérgicas en la mejora de la fagocitosis y la eliminación de LSC de AML en comparación con el uso de anticuerpos individuales.

10 15 [0020] Los marcadores AMLSC son útiles como dianas de anticuerpos monoclonales para su uso en la purga ex vivo de productos de células madre autólogas (sangre periférica movilizada o médula ósea) para su uso en trasplante autólogo para pacientes con leucemia mieloide aguda o las condiciones preleucémicas descritas anteriormente. Las combinaciones de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de superficie celular específicas de las LSC de AML, como se ha descrito anteriormente, pueden ser sinérgicas en la eliminación de las LSC.

20 25 [0021] Los marcadores AMLSC son útiles en aplicaciones de diagnóstico clínico incluyendo, sin limitación, el diagnóstico primario de AML o condiciones pre-leucémicas a partir de muestras de sangre y/o médula ósea, evaluación de la afectación leucémica de los fluidos cerebroespinales y otros fluidos corporales, monitorización de la progresión de la enfermedad a intervalos, y monitorización del estado de enfermedad residual mínima.

30 35 [0022] Como alternativa a los anticuerpos monoclonales, los ligandos de los marcadores de las AMLSC, ya sea como agentes únicos o en combinación, pueden usarse para dirigirlos en la AML o en las condiciones preleucémicas descritas anteriormente. Los ligandos pueden ser libres o conjugados, para administración directa a pacientes o para purga ex vivo de productos de células madre autólogas. Algunas moléculas específicas y sus ligandos incluyen, sin limitación, la proteína de fusión CD155-Fc que se une a CD96; TIP39 que se une a PTHR2; Galectina-9 que se une a HAVCR2.

40 45 [0023] Las células AMLSC pueden aislarse o identificarse prospectivamente a partir de muestras de tumores primarios, y poseen las propiedades únicas de las células madre cancerosas en ensayos funcionales de autorrenovación y diferenciación de células madre cancerosas.

50 55 [0024] En algunos casos, aquí se describen métodos para la detección, clasificación o estadificación clínica de leucemias mieloídes agudas según las células madre presentes en la leucemia, donde un mayor número de células madre es indicativo de un fenotipo de cáncer más agresivo. La estadificación es útil para el pronóstico y el tratamiento. En algunos casos, una muestra tumoral se analiza mediante histoquímica, incluyendo inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y similares, para detectar la presencia de células CD34⁺CD38⁻ que expresan uno o más marcadores AMLSC descritos en el presente documento. La presencia de tales células indica la presencia de AMLSC.

60 65 [0025] En otra instancia, se divultan métodos para el aislamiento de AMLSC, que comprenden el contacto de una población de células candidatas con un reactivo de unión específico para uno o más de los marcadores AMLSC descritos aquí, y la selección de células que se han unido al reactivo(s). Las células pueden seleccionarse además como CD34⁺CD38⁻. Las células son útiles para la evaluación experimental y como fuente de productos específicos de linaje y célula, incluidas especies de ARNm útiles para identificar genes expresados específicamente en estas células, y como dianas para el descubrimiento de factores o moléculas que puedan afectarlas. La AMLSC puede utilizarse, por ejemplo, en un método de cribado de un compuesto para determinar su efecto sobre las células. Esto implica combinar el compuesto con la población celular de la divulgación, y luego determinar cualquier efecto modulador resultante del compuesto. Esto puede incluir el examen de las células para determinar su viabilidad, toxicidad, cambios metabólicos o un efecto sobre la función celular. El fenotipo de AMLSC aquí descrito proporciona un medio para predecir la progresión de la enfermedad, la recaída y el desarrollo de resistencia a los fármacos.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026]

60 65 **Figura 1:** Expresión génica diferencial entre el LSC de AML y el HSC y el MPP de la médula ósea normal (A) Mapas de calor que muestran los genes con una expresión diferencial de al menos 2 veces entre el HSC de la médula ósea (n=4) y el LSC de AML (n=9) o el MPP de la médula ósea (n=4) y el LSC de AML (n=9). La expresión relativa a la mediana se indica para los genes con p<0,05 y un FDR del 5%. (B) Lista seleccionada de proteínas transmembrana cuya expresión es al menos 2 veces mayor en las LSC de AML que en las HSC de MPP. NS: no significativo.

70 75 Figura 2. CD47 se expresa en mayor medida en las LSC de AML. Se examinó la expresión de CD47 en las HSC y LSC de AML de sangre periférica movilizada (MPB) mediante citometría de flujo. (A) Gráficos

representativos de citometría de flujo que indican la expresión de CD47 en relación con un control de isotipo. (B) Resumen de la expresión de CD47 en todas las muestras analizadas, con las medias indicadas.

5 **Figura 3:** El Anticuerpo Anti-CD47 Estimula In Vitro la Fagocitosis Macrofágica de las LSC Primarias de AML Humana. Las LSC de AML se purificaron mediante FACS a partir de dos muestras primarias de AML humana, se marcaron con el colorante fluorescente CFSE y se incubaron con macrófagos derivados de médula ósea de ratón en presencia de un control del isotipo (A) o de un anticuerpo anti-CD47 (B). Estas células se evaluaron mediante microscopía de inmunofluorescencia para detectar la presencia de LSC marcadas con fluorescencia dentro de los macrófagos. (C) El índice fagocítico se determinó para cada condición calculando el número de células ingeridas por cada 100 macrófagos.

10 Figura 4. El anticuerpo anti-CD47 estimula in vitro la fagocitosis macrofágica de LSC primarias humanas de AML. Las LSC de AML se purificaron mediante FACS a partir de dos muestras primarias de AML humana y se marcaron con el colorante fluorescente CFSE. Estas células se incubaron con macrófagos derivados de médula ósea de ratón, bien en presencia de un control de isotipo coincidente (izquierda) o de un anticuerpo anti-CD47 (derecha). Se recogieron los macrófagos, se tiñeron con un anticuerpo anti-macrófago de ratón marcado con fluorescencia y se analizaron mediante citometría de flujo. Los eventos doblemente positivos mMac+CFSE+ identifican macrófagos que han fagocitado LSC marcadas con CFSE. (A,B) dos muestras primarias independientes de LSC de AML.

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

20 Figura 6A-B: Expresión de CD99 en las LSC de AML en comparación con las HSC normales. Se examinó la expresión de CD99 en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y de LSC de AML humana de novo (n=7). Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD99 en HSC y LSC (izquierda) y resumen de la intensidad de fluorescencia media normalizada (MFI) de todos los especímenes (derecha). La expresión media de CD99 aumentó 5,6 veces en las LSC de AML en comparación con las HSC (p=0,05).

25 Figura 7A-B: Expresión de CD97 en las LSC de AML en comparación con las HSC normales. Se examinó la expresión de CD97 en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y de LSC de AML humana de novo (n=7). Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD97 en HSC y LSC (izquierda) y resumen de la intensidad de fluorescencia media normalizada (MFI) de todos los especímenes (derecha). La expresión media de CD97 aumentó 7,9 veces en las LSC de AML en comparación con las HSC (p=0,03).

30 Figura 8A-B: Expresión de CD180 en las LSC de AML en comparación con las HSC normales. Se examinó la expresión de CD180 en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y de LSC de AML humana de novo (n=7). Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD180 en HSC y LSC (izquierda) y resumen de la intensidad de fluorescencia media normalizada (MFI) de todos los especímenes (derecha). La expresión media de CD180 aumentó 60 veces en las LSC de AML en comparación con las HSC (p=0,20).

35 Figura 9A-B: Expresión de TIM3 en las LSC de AML en comparación con las HSC normales. Se examinó la expresión de TIM3 en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y de LSC de AML humana de novo (n=14). Se muestran histogramas representativos de la expresión de TIM3 en HSC y LSC (izquierda) y resumen de la intensidad de fluorescencia media normalizada (MFI) de todos los especímenes (derecha). La expresión media de TIM3 aumentó 9 veces en las LSC de AML en comparación con las HSC (p=0,01).

40 **Figura 10:** Expresión de PTH2R en LSC de AML en comparación con HSC normales. Se examinó la expresión de PTH2R en varias muestras de HSC de médula ósea humana normal (n=3) y de LSC de AML humana de novo (n=9). La expresión se determinó mediante qRT-PCR y se expresa en relación con beta-actina como control. La expresión media de PTH2R aumentó 21 veces en las LSC de AML en comparación con las HSC (p<0,001).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 **[0027]** La presente divulgación identifica polinucleótidos, así como polipéptidos codificados por los mismos, que se expresan diferencialmente en células madre de leucemia mieloide aguda (AMLSC). Se proporcionan métodos en los que estos polinucleótidos y polipéptidos, que pueden denominarse colectivamente marcadores AMLSC, se utilizan para detectar, evaluar y reducir el crecimiento de células cancerosas. Los métodos pueden utilizar uno o una combinación de marcadores, donde una combinación puede incluir 2, 3 o más marcadores, y en algunos casos incluirá CD47 en combinación con 1, 2 o más marcadores. Los marcadores divulgados encuentran uso en la prevención, tratamiento, detección o investigación de condiciones leucémicas y pre-leucémicas.

50 **[0028]** Los marcadores de la divulgación, en algunos casos, se expresan en la superficie de las células AMLSC. En algunos casos, los marcadores se expresan a un nivel al menos 2 veces superior al nivel de expresión de una célula homóloga no transformada, p. ej., una célula madre hematopoyética humana y/o una célula progenitora multipotente

hematopoyética humana, donde la expresión puede determinarse como el nivel de transcripción, la acumulación de ARNm y/o la acumulación de proteínas. En otros casos, los marcadores se expresan a un nivel al menos 3X, al menos 4X, al menos 5X, al menos 10X, al menos 20X o mayor, que el nivel de expresión de una célula homóloga no transformada.

5 **[0029]** En el presente documento se describen métodos para utilizar los marcadores descritos en el presente documento en el diagnóstico del cáncer, la clasificación y el tratamiento de condiciones leucémicas y preleucémicas de acuerdo con los perfiles de expresión. Los métodos son útiles para detectar AMLSC, facilitar el diagnóstico de AML y la gravedad del cáncer (p. ej., grado tumoral, carga tumoral y similares) en un sujeto, facilitar la determinación del pronóstico de un sujeto y evaluar la capacidad de respuesta del sujeto a la terapia. Los métodos de detección de la divulgación pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*, en células aisladas, o en tejidos enteros o un fluido corporal, *p. ej.*, sangre, muestras de biopsia de ganglios linfáticos, y similares.

10 **[0030]** Tal como se usan aquí, los términos "un gen que se expresa diferencialmente en una célula madre cancerosa" y "un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula madre cancerosa", se usan indistintamente aquí, y generalmente se refieren a un polinucleótido que representa o corresponde a un gen que se expresa diferencialmente en una célula madre cancerosa cuando se compara con una célula del mismo tipo celular que no es cancerosa, *p. ej.*, el ARNm se encuentra en niveles al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 50% a aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, o al menos 15 **aproximadamente 50 veces o más, diferentes** (*p. ej.*, más altos o más bajos). La comparación puede realizarse entre las AMLSC y las células homólogas normales una célula madre hematopoyética humana (HSC), que incluye sin limitación células que tienen el fenotipo $\text{Lin-CD34+CD38-CD90+}$, o el fenotipo $\text{Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA-}$ y una célula progenitora multipotente hematopoyética humana (MPP), que incluye sin limitación células que tienen el fenotipo $\text{Lin-CD34+CD38-CD90-}$, o el fenotipo $\text{Lin-CD34+CD38-CD90-CD45RA-}$. El término "marcador polipeptídico de una célula madre cancerosa" se refiere a un polipéptido codificado por un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula madre cancerosa.

20 **[0031]** En algunos casos, se demuestra por citometría de flujo que los marcadores están presentes en una mayoría de las AMLSC, cuando se comparan con las HSC o MPP humanas, como se ha definido anteriormente. Tales marcadores incluyen, sin limitación, CD47, CD96, CD97 y CD99.

25 **[0032]** En otros casos, los marcadores están ausentes en HSC o MPP humanas, pero se expresan altamente en AMLSC. Dichos marcadores incluyen, sin limitación, los establecidos en la Tabla 1.

30 **[0033]** En otros casos, los marcadores se expresan diferencialmente en las AMLSC, en comparación con las HSC o MPP humanas. Dichos marcadores incluyen, sin limitación, los establecidos en la Tabla 1.

35 **[0034]** Un polinucleótido o secuencia que corresponde a, o representa un gen significa que al menos una parte de una secuencia del polinucleótido está presente en el gen o en el producto génico de ácido nucleico (*p. ej.*, ARNm o ADNc). Un ácido nucleico sujeto también puede ser "identificado" por un polinucleótido si el polinucleótido corresponde al gen o lo representa. Los genes identificados por un polinucleótido pueden tener toda o una parte de la secuencia identificadora totalmente presente dentro de un exón de una secuencia genómica del gen, o diferentes porciones de la secuencia del polinucleótido pueden estar presentes en diferentes exones (*p. ej.*, de forma que la secuencia polinucleotídica contigua esté presente en un ARNm, ya sea pre o post empalme, que sea un producto de expresión del gen). Una "secuencia identificadora" es un fragmento mínimo de una secuencia de nucleótidos contiguos que identifica o define de forma única una secuencia polinucleotídica o su complemento.

40 **[0035]** El polinucleótido puede representar o corresponder a un gen modificado en una célula madre cancerosa (CSC) en relación con una célula normal. El gen en el CSC puede contener una delección, inserción, sustitución o translocación relativa al polinucleótido y puede tener secuencias reguladoras alteradas, o puede codificar un producto génico variante de empalme, por ejemplo. El gen del CSC puede modificarse mediante la inserción de un retrovirus endógeno, un elemento transponible u otro ácido nucleico natural o no natural.

45 **[0036]** Las secuencias de interés incluyen las establecidas en la Tabla 1, que se expresan diferencialmente en las AMLSC en relación con las células homólogas normales.

50 **[0037]** También se proporcionan métodos para optimizar la terapia, mediante una primera clasificación, y basándose en esa información, seleccionar la terapia apropiada, la dosis, la modalidad de tratamiento, *etc.* que optimiza el diferencial entre la entrega de un tratamiento antiproliferativo a las células diana indeseables, al tiempo que minimiza la toxicidad indeseable. El tratamiento se optimiza mediante la selección de un tratamiento que minimice la toxicidad indeseable, al tiempo que proporciona una actividad antiproliferativa eficaz.

55 **[0038]** La invención encuentra uso en la prevención o tratamiento de leucemias mieloides agudas. Las leucemias agudas son leucemias de progresión rápida caracterizadas por la sustitución de la médula ósea normal por células blásticas de un clon surgido de la transformación maligna de una célula madre hematopoyética. Las leucemias agudas incluyen la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y la leucemia mielógena aguda (AML). La ALL suele afectar al CNS, mientras que la leucemia monoblástica aguda afecta a las encías, y la AML a colecciones localizadas en cualquier sitio (sarcomas

granulocíticos o cloromas). La AML es la leucemia aguda más frecuente que afecta a los adultos, y su incidencia aumenta con la edad. Aunque la AML es una enfermedad relativamente rara en general, que representa aproximadamente el 1,2% de las muertes por cáncer en los Estados Unidos, se prevé que su incidencia aumente a medida que la población envejece.

5 [0039] Los síntomas de presentación suelen ser inespecíficos (p. ej., fatiga, fiebre, malestar, pérdida de peso) y reflejan el fracaso de la hematopoyesis normal. La anemia y la trombocitopenia son muy frecuentes (75 a 90%). El recuento de glóbulos blancos puede estar disminuido, normal o aumentado. Las células blásticas suelen encontrarse en el frotis sanguíneo a menos que el recuento de glóbulos blancos esté muy disminuido. Los blastos de la ALL pueden distinguirse de los de la AML mediante estudios histoquímicos, citogenéticos, inmunofenotípicos y de biología molecular. Además de frotis con las tinciones habituales, transferasa terminal, mieloperoxidasa, negro Sudán B y esterasa específica e inespecífica.

10 15 [0040] "Diagnóstico" como se usa aquí generalmente incluye determinación de la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad o desorden, determinación de si un sujeto está actualmente afectado por una enfermedad o desorden, pronóstico de un sujeto afectado por una enfermedad o desorden (p. ej., identificación de estados cancerosos, etapas del cáncer, o respuesta del cáncer a la terapia), y uso de terametría (p. ej., monitoreo de la condición de un sujeto para proveer información sobre el efecto o eficacia de la terapia).

20 25 [0041] El término "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un organismo y que pueden utilizarse en un ensayo de diagnóstico o de seguimiento. El término abarca la sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos y su progenie. El término engloba las muestras que han sido manipuladas de alguna manera tras su obtención, como por ejemplo mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para determinados componentes. El término abarca una muestra clínica, y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido.

30 35 [0042] Los términos "tratamiento", "en tratamiento", "tratar" y similares se utilizan aquí para referirse en general a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de estabilización parcial o completa o curación de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o síntoma en un sujeto que puede estar predisposto a la enfermedad o síntoma pero al que aún no se le ha diagnosticado; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

40 [0043] Los términos "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea un diagnóstico, tratamiento o terapia, en particular los seres humanos.

45 [0044] Una "célula huésped", tal como se utiliza aquí, se refiere a un microorganismo o a una célula eucariota o línea celular cultivada como entidad unicelular que puede ser, o ha sido, utilizada como receptora de un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, e incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Se entiende que la progenie de una sola célula puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento genómico o total de ADN que el progenitor original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

50 55 [0045] Los términos "cáncer", "neoplasia", "tumor" y "carcinoma" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a células que presentan un crecimiento relativamente autónomo, de modo que muestran un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. En general, las células de interés para la detección o el tratamiento en la presente aplicación incluyen células precancerosas (p. ej., benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. La detección de células cancerosas reviste especial interés. El término "normal", utilizado en el contexto de "célula normal", se refiere a una célula de fenotipo no transformado o que presenta la morfología de una célula no transformada del tipo de tejido examinado. "Fenotipo canceroso" se refiere generalmente a cualquiera de una variedad de fenómenos biológicos que son característicos de una célula cancerosa, fenómenos que pueden variar con el tipo de cáncer. El fenotipo canceroso se identifica generalmente por anomalías en, por ejemplo, el crecimiento o la proliferación celular (p. ej., crecimiento o proliferación incontrolados), la regulación del ciclo celular, la movilidad celular, la interacción célula-célula, o la metástasis, etc.

60 65 [0046] "Diana terapéutica" se refiere a un gen o producto génico que, tras la modulación de su actividad (p. ej., mediante la modulación de la expresión, la actividad biológica y similares), puede proporcionar la modulación del fenotipo canceroso. Tal y como se utiliza en este documento, "modulación" se refiere a un aumento o una disminución del fenómeno indicado (p. ej., a modulación de una actividad biológica se refiere a un aumento de una actividad biológica o a una disminución de una actividad biológica).

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

[0047] Leucemia Mielocítica Aguda (AML, Leucemia Mielógena Aguda; Leucemia Mieloide Aguda). En la AML, la

transformación maligna y la proliferación incontrolada de una célula progenitora mieloide anormalmente diferenciada y de larga vida dan lugar a un elevado número circulante de formas sanguíneas inmaduras y a la sustitución de la médula normal por células malignas. Los síntomas incluyen fatiga, palidez, fácil aparición de hematomas y hemorragias, fiebre e infección; los síntomas de infiltración leucémica sólo están presentes en aproximadamente el 5% de los pacientes (a menudo como manifestaciones cutáneas). El examen del frotis de sangre periférica y de la médula ósea es diagnóstico. El tratamiento incluye quimioterapia de inducción para lograr la remisión y quimioterapia posremisión (con o sin trasplante de células madre) para evitar la recaída.

5 [0048] La AML tiene varios subtipos que se distinguen entre sí por su morfología, inmunofenotipo y citoquímica. Se describen cinco clases basadas en el tipo celular predominante: mieloide, mieloide-monocítica, monocítica, eritroide y megacariocítica. La leucemia promielocítica aguda es un subtipo particularmente importante, que representa entre el 10 y el 15% de todos los casos de AML, que afecta a un grupo de edad más joven (mediana de edad: 31 años) y a un grupo étnico concreto (hispanos), en el que el paciente suele presentar un trastorno de la coagulación.

10 [0049] Las tasas de inducción de remisión oscilan entre el 50 y el 85%. Según los informes, la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo se da en el 20-40% de los pacientes y aumenta hasta el 40-50% en los pacientes más jóvenes tratados con trasplante de células madre.

15 [0050] Los factores pronósticos ayudan a determinar el protocolo y la intensidad del tratamiento; los pacientes con 20 características pronósticas muy negativas suelen recibir formas más intensas de terapia, porque se cree que los beneficios potenciales justifican el aumento de la toxicidad del tratamiento. El factor pronóstico más importante es el cariotipo de la célula leucémica; los cariotipos favorables incluyen t(15;17), t(8;21) e inv16 (p13;q22). Los factores negativos incluyen la edad avanzada, una fase mielodisplásica precedente, leucemia secundaria, recuento elevado de glóbulos blancos y ausencia de barras de Auer. La clasificación FAB o de la WHO por sí sola no predice la respuesta.

25 [0051] La terapia inicial intenta inducir la remisión y difiere más de la ALL en que la AML responde a menos fármacos. El régimen básico de inducción incluye citarabina mediante infusión IV continua o dosis altas durante 5 a 7 días; durante este tiempo se administra daunorubicina o idarubicina IV durante 3 días. Algunos regímenes incluyen 6-tioguanina, etopósido, vincristina y prednisona, pero su contribución no está clara. El tratamiento suele provocar una mielosupresión 30 importante, con infección o hemorragia; existe una latencia importante antes de la recuperación de la médula. Durante este tiempo, es vital una meticulosa atención preventiva y de apoyo.

SECUENCIAS POLIPEPTÍDICAS Y POLINUCLEOTÍDICAS Y ANTICUERPOS

35 [0052] Aquí se divultan polinucleótidos y polipéptidos que representan genes que se expresan diferencialmente en las AMLSC humanas. Estos polinucleótidos, polipéptidos y fragmentos de los mismos tienen usos que incluyen, pero no se limitan a, sondas y cebadores de diagnóstico como materiales de partida para sondas y cebadores, como inmunógenos para anticuerpos útiles en el diagnóstico y terapia del cáncer, y similares como se discute en el presente documento.

40 [0053] Las composiciones de ácido nucleico incluyen fragmentos y cebadores, y tienen al menos unos 15 pb de longitud, al menos unos 30 pb de longitud, al menos unos 50 pb de longitud, al menos unos 100 pb, al menos unos 200 pb de longitud, al menos unos 300 pb de longitud, al menos unos 500 pb de longitud, al menos unos 800 pb de longitud, al menos unos 1 kb de longitud, al menos unos 2,0 kb de longitud, al menos unos 5 kb de longitud, al menos unos 10 kb de longitud, al menos unos 50 kb de longitud y normalmente tienen menos de unos 200 pb de longitud. 0 kb de longitud, al menos 3,0 kb de longitud, al menos 5 kb de longitud, al menos 10 kb de longitud, al menos 50 kb de longitud y normalmente menos de 200 kb de longitud. En algunos casos, un fragmento de un polinucleótido es la secuencia codificante de un polinucleótido. También se incluyen variantes o variantes degeneradas de una secuencia proporcionada en el presente documento. En general, las variantes de un polinucleótido proporcionadas en el presente documento tienen un fragmento de identidad de secuencia que es mayor que al menos aproximadamente el 65%, mayor que al menos aproximadamente el 70%, mayor que al menos aproximadamente el 75%, mayor que al menos aproximadamente el 80%, mayor que al menos aproximadamente el 85%, o mayor que al menos aproximadamente el 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más (es decir, es decir, 100%) en comparación con un fragmento de tamaño idéntico de una secuencia proporcionada, según lo determinado por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman implementado en el programa MPSRCH (Oxford Molecular). Los ácidos nucleicos que tienen similitud de secuencia pueden detectarse por hibridación en 45 condiciones de baja rigurosidad, por ejemplo, a 50° C. y 10XSSC (solución salina 0,9 M/0,09 M de citrato sódico) y permanecer unidos cuando se someten a lavado a 55° C. en 1XSSC. La identidad de secuencia puede determinarse mediante hibridación en condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo, a 50° C. o más y 0,1XSSC (9 mM de solución salina/0,9 mM de citrato sódico). Los métodos y condiciones de hibridación son bien conocidos en la técnica, véase, p. ej., Pat. de EE. UU. N.º 5,707,829. Los ácidos nucleicos que son sustancialmente idénticos a las secuencias 50 polinucleotídicas proporcionadas, p. ej., variantes alélicas, versiones genéticamente alteradas del gen, etc., se unen a las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en condiciones de hibridación estrictas.

55 [0054] Las sondas específicas para los polinucleótidos aquí descritos pueden generarse utilizando las secuencias de polinucleótidos aquí descritas. Las sondas suelen ser fragmentos de secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento. Las sondas pueden sintetizarse químicamente o generarse a partir de polinucleótidos más largos utilizando enzimas de restricción. Las sondas pueden estar marcadas, por ejemplo, con una marcación radiactiva,

biotinilada o fluorescente. Preferiblemente, las sondas se diseñan basándose en una secuencia identificadora de cualquiera de las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento.

5 **[0055]** Las composiciones de ácido nucleico aquí descritas pueden utilizarse, por ejemplo, para producir polipéptidos, como sondas para la detección de ARNm en muestras biológicas (p. ej., extractos de células humanas) o ADNc producido a partir de dichas muestras, para generar copias adicionales de los polinucleótidos, para generar ribozimas u oligonucleótidos antisentido, y como sondas de ADN monocatenario o como oligonucleótidos formadores de triple cadena.

10 **[0056]** Las sondas aquí descritas pueden utilizarse para, por ejemplo, determinar la presencia o ausencia de cualquiera de los polinucleótidos aquí proporcionados o variantes de los mismos en una muestra. Estos y otros usos se describen con más detalle a continuación. En un caso, se utiliza el análisis PCR en tiempo real para analizar la expresión génica.

15 **[0057]** Los polipéptidos contemplados por la divulgación incluyen los codificados por los polinucleótidos divulgados y los genes a los que corresponden estos polinucleótidos, así como los ácidos nucleicos que, en virtud de la degeneración del código genético, no son idénticos en secuencia a los polinucleótidos divulgados. Otros polipéptidos contemplados incluyen polipéptidos que están codificados por polinucleótidos que hibridan con el polinucleótido del listado de secuencias. Así, la divulgación incluye un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de cualquiera de las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento, o una variante de la misma.

20 **[0058]** En general, el término "polipéptido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere tanto al polipéptido de longitud completa codificado por el polinucleótido mencionado, el polipéptido codificado por el gen representado por el polinucleótido mencionado, como a porciones o fragmentos de los mismos. "Polipéptidos" también incluye las variantes de las proteínas naturales, cuando dichas variantes son homólogas o sustancialmente similares a la proteína natural, y pueden ser de origen de la misma especie o de especies diferentes a la proteína natural. En general, los polipéptidos variantes tienen una secuencia que tiene al menos un 80%, normalmente al menos un 90%, y más habitualmente al menos un 98% de identidad de secuencia con un polipéptido expresado diferencialmente descrito en el presente documento. Los polipéptidos variantes pueden estar glicosilados de forma natural o no natural, es decir, el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en la proteína natural correspondiente.

25 **[0059]** Los fragmentos de los polipéptidos aquí divulgados, en particular los fragmentos biológicamente activos y/o los fragmentos correspondientes a dominios funcionales, son de interés. Los fragmentos de interés tendrán típicamente una longitud de al menos unos 10 aa a al menos unos 15 aa, normalmente de al menos unos 50 aa, y pueden tener una longitud de hasta 300 aa o más, pero normalmente no excederán de unos 1000 aa, donde el fragmento tendrá un tramo de aminoácidos que es idéntico a un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento, o un homólogo del mismo. Un fragmento "de al menos 20 aa de longitud", por ejemplo, pretende incluir 20 o más aminoácidos contiguos de, por ejemplo, el polipéptido codificado por un ADNc, en un clón de ADNc contenido en una biblioteca depositada o el soporte complementario del mismo. En este contexto, "aproximadamente" incluye el valor particularmente citado o un valor mayor o menor en varios (5, 4, 3, 2 o 1) aminoácidos. Las variantes proteínicas aquí descritas están codificadas por polinucleótidos que también se divulan. El código genético permite seleccionar los codones adecuados para construir las variantes correspondientes. Los polinucleótidos pueden utilizarse para producir polipéptidos, y estos polipéptidos pueden utilizarse para producir anticuerpos mediante métodos conocidos descritos anteriormente y más adelante.

35 **[0060]** Un polipéptido puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos, como la precipitación con sulfato de amonio o etanol, la extracción ácida, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía de fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de hidroxapatita y la cromatografía de lectinas. Para la purificación se emplea preferentemente la cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC").

40 **[0061]** Los polipéptidos también pueden recuperarse de: productos purificados a partir de fuentes naturales, incluidos fluidos corporales, tejidos y células, ya sea directamente aislados o cultivados; productos de procedimientos químicos sintéticos; y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped procariota o eucariota, incluidas, por ejemplo, células bacterianas, de levaduras superiores, de plantas, de insectos y de mamíferos.

45 **[0062]** Los productos génicos, incluidos los polipéptidos, el ARNm (en particular los ARNm que tienen estructuras secundarias y/o terciarias distintas), el ADNc o el gen completo, pueden prepararse y utilizarse para criar anticuerpos con fines experimentales, diagnósticos y terapéuticos. Pueden utilizarse anticuerpos para identificar células o subtipos de AMLSC. El polinucleótido o ADNc relacionado se expresa como se describe en el presente documento y se preparan los anticuerpos. Estos anticuerpos son específicos de un epítopo del polipéptido codificado por el polinucleótido, y pueden precipitar o unirse a la proteína nativa correspondiente en una preparación celular o tisular o en un extracto libre de células de un sistema de expresión in vitro.

50 **[0063]** Los anticuerpos pueden utilizarse para el inmunofenotipado de células y muestras biológicas. El producto de traducción de un gen expresado diferencialmente puede ser útil como marcador. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítopo específico, o una combinación de epítopos, permitirán el cribado de poblaciones celulares que expresen el marcador. Se pueden utilizar varias técnicas con anticuerpos monoclonales para detectar poblaciones celulares que

expresen el marcador o marcadores, como la separación magnética con perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos, el "barrido" con anticuerpos adheridos a una matriz sólida (es decir, una placa) y la citometría de flujo (véase, p. ej., Pat. de EE. UU. N.º 5.985.660; y Morrison et al. Cell, 96:737-49 (1999)). Estas técnicas permiten el cribado de poblaciones particulares de células; en inmunohistoquímica de muestras de biopsia; en la detección de la presencia de marcadores vertidos por las células cancerosas en la sangre y otros fluidos biológicos, y similares.

5 [0064] En muchos casos, se miden los niveles de un gen o producto génico sujeto. Por medir se entiende estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel del producto génico en una primera muestra biológica, ya sea directamente (p. ej., determinando o estimando los niveles absolutos del producto génico) o relativamente comparando los niveles con una 10 segunda muestra biológica de control. En muchos casos, la segunda muestra biológica de control se obtiene de un individuo que no tiene cáncer. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce un nivel de control estándar de expresión génica, puede utilizarse repetidamente como estándar de comparación. Otras muestras de control incluyen muestras de tejido canceroso.

15 [0065] Los métodos pueden utilizarse para detectar y/o medir los niveles de ARNm de un gen que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. En algunos casos, los métodos comprenden: poner en contacto una muestra con un polinucleótido que corresponde a un gen expresado diferencialmente descrito en el presente documento en condiciones que permitan la hibridación; y detectar la hibridación, si la hay. La detección de hibridación diferencial, cuando 20 se compara con un control adecuado, es una indicación de la presencia en la muestra de un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. Los controles apropiados incluyen, por ejemplo, una muestra que se sabe que no contiene un polinucleótido que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa. Las condiciones que permiten la hibridación son conocidas en la técnica y se han descrito anteriormente con más detalle.

25 [0066] La detección también puede llevarse a cabo por cualquier método conocido, incluyendo, pero sin limitarse a, hibridación in situ, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR (transcripción inversa-PCR), y "Northern" o transferencia de ARN, matrices, micromatrices, etc, o combinaciones de dichas técnicas, utilizando un polinucleótido adecuadamente marcado. Una variedad de marcaciones y métodos de marcación para polinucleótidos son conocidos en el arte y se pueden utilizar en los métodos de ensayo de la divulgación. La hibridación específica puede determinarse por 30 comparación con los controles apropiados.

35 [0067] Las sondas de ácido nucleico marcadas pueden utilizarse para detectar la expresión de un gen correspondiente al polinucleótido proporcionado, p. ej., en un formato de macromatrices, transferencia de Northern, etc. La cantidad de hibridación puede cuantificarse para determinar cantidades relativas de expresión, por ejemplo en una condición determinada. Las sondas se utilizan para la hibridación in situ en células para detectar la expresión. Las sondas también 40 pueden utilizarse in vivo para la detección diagnóstica de secuencias hibridantes. Las sondas pueden estar marcadas con un isótopo radiactivo. Pueden utilizarse otros tipos de marcaciones detectables, como cromóforos, fluoróforos y enzimas.

45 [0068] Las matrices de polinucleótidos proporcionan una técnica de alto rendimiento que puede analizar un gran número de polinucleótidos o polipéptidos en una muestra. Esta tecnología puede utilizarse como herramienta para comprobar la expresión diferencial. Una variedad de métodos de producción de matrices, así como variaciones de estos métodos, son conocidos en la materia y contemplados para su uso. Por ejemplo, las matrices pueden crearse colocando sondas de polinucleótidos sobre un sustrato (p. ej., vidrio, nitrocelulosa, etc.) en una matriz o matriz bidimensional con sondas unidas. Las sondas pueden unirse al sustrato mediante enlaces covalentes o mediante interacciones no específicas, como las interacciones hidrofóbicas.

45 CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

50 [0069] En las leucemias mieloides agudas, la caracterización de las células madre cancerosas permite el desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos específicamente contra esta población crítica de células, en particular su capacidad de autorrenovación, lo que da lugar a terapias más eficaces.

55 [0070] En las leucemias mieloides agudas humanas se demuestra aquí que existe una subpoblación de células cancerosas tumorigénicas con capacidad tanto de autorrenovación como de diferenciación. Estas células tumorigénicas son responsables del mantenimiento del tumor, y también dan lugar a un gran número de progenie anormalmente diferenciada que no es tumorigénica, cumpliendo así los criterios de las células madre cancerígenas. El potencial tumorigénico está contenido en una subpoblación de células cancerosas que expresan diferencialmente los marcadores de la presente divulgación.

60 [0071] En algunos casos, el número de AMLSC en una muestra de paciente se determina en relación con el número total de células cancerosas de AML, donde un mayor porcentaje de AMLSC es indicativo del potencial de autorrenovación continua de células con el fenotipo canceroso. La cuantificación de AMLSC en una muestra de paciente puede compararse con una población de referencia, p. ej., una muestra de paciente como una muestra de sangre, una muestra de paciente en remisión, etc. En algunos casos, la cuantificación de AMLSC se realiza durante el curso del tratamiento, donde el 65 número de células cancerosas de AML y el porcentaje de tales células que son AMLSC se cuantifican antes, durante y como seguimiento de un curso de terapia. De forma deseable, la terapia dirigida a las células madre cancerosas produce una disminución del número total y/o del porcentaje de AMLSC en una muestra de paciente.

5 [0072] En otros casos, los agentes anticancerígenos se dirigen a las AMLSC mediante la unión específica a un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación. En tales casos, los agentes anticancerígenos incluyen anticuerpos y derivados de unión a antígeno de los mismos específicos para un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación, que opcionalmente se conjugan con una fracción citotóxica. La depleción de las AMLSC es útil en el tratamiento de la AML. El agotamiento consigue una reducción de las AMLSC circulantes de hasta aproximadamente un 30%, o hasta aproximadamente un 40%, o hasta aproximadamente un 50%, o hasta aproximadamente un 75% o más. La depleción puede lograrse utilizando un agente para depletar las AMLSC *in vivo* o *ex vivo*.

10 10 [0073] Las AMLSC se identifican por su fenotipo con respecto a marcadores particulares, y/o por su fenotipo funcional. En algunos casos, las AMLSC se identifican y/o aíslan uniéndose a la célula con reactivos específicos para los marcadores de interés. Las células que se van a analizar pueden ser células viables, o pueden ser células fijadas o incrustadas.

15 15 [0074] En algunos casos, los reactivos específicos para los marcadores de interés son anticuerpos, que pueden estar marcados directa o indirectamente. Dichos anticuerpos incluirán normalmente anticuerpos específicos para un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación.

20 Tratamiento del cáncer

25 20 [0075] En el presente documento se describen métodos para reducir el crecimiento de células cancerosas. Los métodos proporcionan la disminución del número de células cancerosas que llevan un marcador específico o una combinación de marcadores, como se proporciona en el presente documento, la disminución de la expresión de un gen que se expresa diferencialmente en una célula cancerosa, o la disminución del nivel de y/o la disminución de una actividad de un polipéptido asociado al cáncer. En general, los métodos comprenden poner en contacto una célula cancerosa con un agente de unión, p. ej., un anticuerpo o ligando específico para un marcador o combinación de marcadores proporcionados en el presente documento.

30 30 [0076] "Reducir el crecimiento de células cancerosas" incluye, pero no se limita a, reducir la proliferación de células cancerosas, y reducir la incidencia de que una célula no cancerosa se convierta en una célula cancerosa. La reducción del crecimiento de las células cancerosas puede determinarse fácilmente mediante cualquier ensayo conocido, como la incorporación de 3H -timidina, el recuento del número de células durante un periodo de tiempo, la detección y/o medición de un marcador asociado a la AML, etc.

35 35 [0077] En el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer, que generalmente comprenden la administración a un individuo que los necesita de una sustancia que reduce el crecimiento de células cancerosas, en una cantidad suficiente para reducir el crecimiento de células cancerosas y tratar el cáncer. Si una sustancia, o una cantidad específica de la sustancia, es eficaz en el tratamiento del cáncer puede evaluarse utilizando cualquiera de una variedad de ensayos diagnósticos conocidos para el cáncer, incluyendo, pero no limitado a la biopsia, estudios radiográficos de contraste, tomografía computarizada, y la detección de un marcador tumoral asociado con el cáncer en la sangre del individuo. La sustancia puede administrarse por vía sistémica o local, normalmente por vía sistémica.

40 45 [0078] Una sustancia, p. ej., un fármaco quimioterapéutico que reduce el crecimiento de células cancerosas, puede dirigirse a una célula cancerosa. Así, en algunos casos, el presente documento describe un método para administrar un fármaco a una célula cancerosa, que comprende la administración de un complejo fármaco-anticuerpo a un sujeto, en el que el anticuerpo es específico para un polipéptido asociado al cáncer, y el fármaco es uno que reduce el crecimiento de células cancerosas, una variedad de los cuales son conocidos en la técnica. La focalización puede lograrse mediante el acoplamiento (p. ej., vinculando, directamente o a través de una molécula enlazadora, de forma covalente o no covalente, para formar un complejo fármaco-anticuerpo) de un fármaco a un anticuerpo específico para un polipéptido asociado al cáncer. Los métodos de acoplamiento de un fármaco a un anticuerpo son bien conocidos en la técnica y no es necesario desarrollarlos en el presente documento.

50 Estadificación y diagnóstico

55 55 [0079] Las leucemias mieloides agudas se estadifican mediante el análisis de la presencia de células madre cancerosas. La estadificación es útil para el pronóstico y el tratamiento. En un caso, una muestra de un paciente con leucemia mieloide aguda se tiñe con reactivos específicos para un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación. El análisis de los patrones de tinción proporciona la distribución relativa de AMLSC, cuya distribución predice el estadio de la leucemia. En algunos casos, la muestra se analiza por histoquímica, incluyendo inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, y similares, para detectar la presencia de células CD34 $^{+}$ CD38 $^{-}$ que expresan un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación. La presencia de tales células indica la presencia de LSC de AM.

60 65 [0080] En un caso, la muestra del paciente se compara con un control o un valor de prueba estándar. En otro caso, la muestra del paciente se compara con una muestra previa a la leucemia, o con uno o más puntos temporales a lo largo del curso de la enfermedad.

5 [0081] Las muestras, incluyendo secciones de tejido, portaobjetos, etc. que contienen un tejido de leucemia mieloide aguda, se tiñen con reactivos específicos para marcadores que indican la presencia de células madre cancerosas. Las muestras pueden congelarse, incrustarse, presentarse en un micromatriz tisular, etc. Los reactivos, p. ej., anticuerpos, sondas polinucleotídicas, etc., pueden estar marcados de forma detectable o indirecta en el procedimiento de tinción. Los datos aquí aportados demuestran que el número y la distribución de las células progenitoras son diagnósticos del estadio de la leucemia.

10 [0082] La información así derivada es útil en el pronóstico y el diagnóstico, incluyendo la susceptibilidad a la aceleración de la enfermedad, el estado de un estado enfermo y la respuesta a cambios en el entorno, como el paso del tiempo, el tratamiento con fármacos u otras modalidades. Las células también pueden clasificarse en función de su capacidad para responder a agentes y tratamientos terapéuticos, aislarse con fines de investigación, someterse a un cribado de expresión génica, etc. Las muestras clínicas pueden caracterizarse aún más mediante análisis genéticos, proteómica, tinción de la superficie celular u otros medios, con el fin de determinar la presencia de marcadores útiles para la clasificación. Por ejemplo, las anomalías genéticas pueden ser la causa de la susceptibilidad a enfermedades o de la respuesta a fármacos, o pueden estar relacionadas con dichos fenotipos.

ANÁLISIS CELULAR DIFERENCIAL

20 [0083] La presencia de AMLSC en una muestra de un paciente puede ser indicativa del estadio de la leucemia. Además, la detección de AMLSC puede utilizarse para monitorizar la respuesta a la terapia y ayudar en el pronóstico. La presencia de AMLSC puede determinarse cuantificando las células que tienen el fenotipo de célula madre. Además del fenotipado de la superficie celular, puede ser útil cuantificar las células de una muestra que tienen carácter de "células madre", lo que puede determinarse por criterios funcionales, como la capacidad de autorrenovación, de dar lugar a tumores *in vivo*, p. ej., en un modelo de xenoinjerto, y similares.

25 [0084] Las muestras clínicas para uso en los métodos de la divulgación pueden obtenerse de una variedad de fuentes, particularmente sangre, aunque en algunos casos pueden usarse muestras como médula ósea, linfa, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y similares. Dichas muestras pueden separarse por centrifugación, elutriación, separación en gradiente de densidad, aféresis, selección por afinidad, panning, FACS, centrifugación con Hypaque, etc. antes del análisis, y normalmente se utilizará una fracción mononuclear (PBMC). Una vez obtenida la muestra, puede utilizarse directamente, congelarse o mantenerse en un medio de cultivo adecuado durante breves períodos de tiempo. Se pueden emplear diversos medios para mantener las células. Las muestras pueden obtenerse por cualquier procedimiento conveniente, como la extracción de sangre, venopunción, biopsia o similares. Por lo general, una muestra comprenderá al menos aproximadamente 10^2 células, más habitualmente al menos aproximadamente 10^3 células, y preferiblemente 10^4 , 10^5 o más células. Normalmente, las muestras procederán de pacientes humanos, aunque también pueden utilizarse modelos animales, p. ej., equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos, roedores, p. ej., ratones, ratas, hámster, primates, etc.

40 [0085] Puede utilizarse una solución apropiada para la dispersión o suspensión de la muestra celular. Dicha solución será generalmente una solución salina equilibrada, p. ej., solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, etc., convenientemente suplementada con suero fetal de ternera u otros factores naturales, junto con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5-25 mM. Los tampones más adecuados son HEPES, tampones de fosfato, tampones de lactato, etc.

45 [0086] El análisis de la tinción celular utilizará métodos convencionales. Las técnicas que proporcionan una enumeración precisa incluyen clasificadores celulares activados por fluorescencia, que pueden tener diversos grados de sofisticación, como canales de múltiples colores, canales de detección de dispersión de luz obtusa y de ángulo bajo, canales de impedancia, etc. Las células pueden seleccionarse contra células muertas empleando colorantes asociados a células muertas (p. ej., yoduro de propidio).

50 [0087] Los reactivos de afinidad pueden ser receptores o ligandos específicos para las moléculas de la superficie celular indicadas anteriormente. Además de reactivos de anticuerpos, pueden utilizarse pares péptido-MHC antígeno y receptor de células T; ligandos y receptores peptídicos; moléculas efectoras y receptoras, y similares. Los anticuerpos y los receptores de células T pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser producidos por animales transgénicos, animales inmunizados, células B humanas o animales inmortalizadas, células transfectadas con vectores de ADN que codifican el anticuerpo o el receptor de células T, etc. Los detalles de la preparación de anticuerpos y su idoneidad para el uso como miembros de unión específicos son bien conocidos por los expertos en la materia.

60 [0088] De particular interés es el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. Convenientemente, estos anticuerpos se conjugan con una marcación para su uso en la separación. Las marcaciones incluyen perlas magnéticas, que permiten la separación directa, biotina, que puede eliminarse con avidina o estreptavidina unida a un soporte, fluorocromos, que pueden utilizarse con un clasificador celular activado por fluorescencia, o similares, para facilitar la separación del tipo celular concreto. Entre los fluorocromos utilizados se encuentran las ficoliproteínas, p. ej., la ficoeritrina y las aloficiocianinas, la fluoresceína y el rojo Texas. Con frecuencia, cada anticuerpo está marcado con un fluorocromo diferente, para permitir la clasificación independiente de cada marcador.

5 [0089] Los anticuerpos se añaden a una suspensión de células y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para que se unan a los antígenos de superficie celular disponibles. La incubación suele durar al menos unos 5 minutos y normalmente menos de 30 minutos. Es deseable tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción, de forma que la eficacia de la separación no se vea limitada por la falta de anticuerpos. La concentración adecuada se determina por valoración. El medio en el que se separan las células será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es la solución salina tamponada con fosfato que contiene de 0,1 a 0,5% de BSA. Existen diversos medios disponibles en el mercado que pueden utilizarse en función de la naturaleza de las células, como el medio Eagle modificado de Dulbecco (dMEM), la solución salina básica de Hank (HBSS), la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMI, el medio de Iscove, PBS con 5 mM de EDTA, etc., a menudo complementados con suero fetal de ternera, BSA, HSA, etc.

10

15 [0090] A continuación, las células marcadas se cuantifican en cuanto a la expresión de marcadores de superficie celular como se ha descrito anteriormente.

20 25 [0091] La comparación de un análisis diferencial de progenitores obtenido a partir de una muestra de un paciente, y un análisis diferencial de progenitores de referencia se lleva a cabo mediante el uso de protocolos de deducción adecuados, sistemas de IA, comparaciones estadísticas, etc. Una comparación con un análisis diferencial de progenitores de referencia a partir de células normales, células de un tejido con una enfermedad similar, y similares, puede proporcionar una indicación del estadio de la enfermedad. Se puede compilar una base de datos de análisis diferenciales de progenitores de referencia. Un análisis de especial interés realiza el seguimiento de un paciente, p. ej., en las fases crónica y preleucémica de la enfermedad, de forma que se observa la aceleración de la enfermedad en una fase temprana. Los métodos de la divulgación proporcionan la detección de la aceleración antes de la aparición de los síntomas clínicos, y por lo tanto permiten la intervención terapéutica temprana, p. ej., el inicio de la quimioterapia, el aumento de la dosis de quimioterapia, el cambio de la selección del fármaco quimioterapéutico, y similares.

Composiciones de la AMLSC

30 [0092] Las AMLSC pueden separarse de una mezcla compleja de células mediante técnicas que enriquecen las células que expresan diferencialmente un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación. Para el aislamiento de células a partir de tejidos, puede utilizarse una solución adecuada para la dispersión o la suspensión. Dicha solución será generalmente una solución salina equilibrada, p. ej., solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, etc., convenientemente suplementada con suero fetal de ternera u otros factores naturales, junto con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5-25 mM. Los tampones más adecuados son HEPES, tampones de fosfato, tampones de lactato, etc.

35 [0093] Las células separadas pueden recogerse en cualquier medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, normalmente con un cojín de suero en el fondo del tubo de recogida. Existen diversos medios disponibles en el mercado que pueden utilizarse en función de la naturaleza de las células, como dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscove, etc., a menudo complementados con suero fetal de ternera.

40 45 [0094] Las composiciones altamente enriquecidas para AMLSC se consiguen de esta manera. La población de sujetos puede ser del 50% o más de la composición celular, y preferiblemente del 75% o más de la composición celular, y puede ser del 90% o más. Las células deseadas se identifican por su fenotipo de superficie, por la capacidad de autorrenovación, la capacidad de formar tumores, etc. La población celular enriquecida puede utilizarse inmediatamente, o puede congelarse a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenarse durante largos períodos de tiempo, descongelarse y poder reutilizarse. Las células pueden almacenarse en un medio con un 10% de DMSO y un 90% de FCS. La población de células enriquecidas para AMLSC puede utilizarse en una variedad de ensayos de cribado y cultivos, como se describe a continuación.

50 [0095] La población enriquecida de AMLSC puede ser cultivada *in vitro* bajo varias condiciones de cultivo. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido, p. ej., contener agar, metilcelulosa, etc. La población celular puede suspenderse convenientemente en un medio nutritivo apropiado, como DMEM modificado de Iscove o RPMI-1640, normalmente suplementado con suero fetal de ternera (alrededor del 5-10%), L-glutamina, un tiol, en particular 2-mercptoetanol, y antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomicina.

55 [0096] El cultivo puede contener factores de crecimiento a los que respondan las células. Los factores de crecimiento, tal como se definen en el presente documento, son moléculas capaces de promover la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación de las células, ya sea en cultivo o en el tejido intacto, a través de efectos específicos sobre un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen polipéptidos y factores no polipeptídicos. En el cultivo de las células puede utilizarse una amplia variedad de factores de crecimiento, p. ej., LIF, factor de acero (ligando c-kit), EGF, insulina, IGF, ligando Flk-2, IL-11, IL-3, GM-CSF, eritropoyetina, trombopoyetina, etc.

60 65 [0097] Además de, o en lugar de factores de crecimiento, las células sujetas pueden crecer en un cocultivo con fibroblastos, estroma u otras células de la capa alimentadora. Las células estromales adecuadas para su uso en el crecimiento de células hematopoyéticas son conocidas en la técnica. Entre ellas se incluyen el estroma de médula ósea utilizado en condiciones de cultivo "Whitlock-Witte" (Whitlock et al. [1985] *Annu Rev Immunol* 3:213-235) o "Dexter" (Dexter

et al. [1977] J Exp Med 145:1612-1616); y las células estromales tímicas heterogéneas.

Ensayos de cribado

- 5 **[0098]** Las AMLSC que expresan un marcador o una combinación de marcadores de la presente divulgación también son útiles para ensayos *in vitro* y cribado para detectar factores y agentes quimioterapéuticos que son activos sobre las células madre cancerosas. De especial interés son los ensayos de detección de agentes activos en células humanas. Para ello, puede utilizarse una amplia variedad de ensayos, como inmunoensayos de unión a proteínas; determinación del crecimiento celular, la diferenciación y la actividad funcional; producción de factores; y similares. En otros casos, los polipéptidos aislados correspondientes a un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación son útiles en ensayos de cribado de fármacos.
- 10 **[0099]** En ensayos de cribado de agentes biológicamente activos, fármacos antiproliferativos, etc., la composición marcadora o AMLSC se pone en contacto con el agente de interés, y el efecto del agente se evalúa monitorizando los parámetros de salida en las células, como la expresión de marcadores, la viabilidad celular y similares; o la eficacia de unión o el efecto sobre la actividad enzimática o receptora de polipéptidos. Las células pueden estar recién aisladas, cultivadas, alteradas genéticamente, y similares. Las células pueden ser variantes de cultivos clonales inducidas por el medio ambiente: p. ej., divididas en cultivos independientes y cultivadas en condiciones distintas, por ejemplo, con o sin fármacos; en presencia o ausencia de citoquinas o combinaciones de las mismas. La forma en que las células responden a un agente, en particular a un agente farmacológico, incluido el momento de las respuestas, es un reflejo importante del estado fisiológico de la célula.
- 15 **[0100]** Los parámetros son componentes cuantificables de las células, particularmente componentes que pueden ser medidos con precisión, deseablemente en un sistema de alto rendimiento. Un parámetro puede ser cualquier componente celular o producto celular, incluido un determinante de la superficie celular, un receptor, una proteína o una modificación conformacional o postraduccional de la misma, un lípido, un hidrato de carbono, una molécula orgánica o inorgánica, un ácido nucleico, p. ej., ARNm, ADN, etc., o una porción derivada de dicho componente celular, o combinaciones de los mismos. Aunque la mayoría de los parámetros proporcionarán una lectura cuantitativa, en algunos casos será aceptable un resultado semicuantitativo o cualitativo. Las lecturas pueden incluir un único valor determinado, o pueden incluir la media, el valor mediano o la varianza, etc. Característicamente, se obtendrá una gama de valores de lectura de parámetros para cada parámetro a partir de una multiplicidad de los mismos ensayos. Se espera variabilidad y se obtendrá una gama de valores para cada uno del conjunto de parámetros de prueba utilizando métodos estadísticos estándar con un método estadístico común utilizado para proporcionar valores únicos.
- 20 **[0101]** Los agentes de interés para el cribado incluyen compuestos conocidos y desconocidos que abarcan numerosas clases químicas, principalmente moléculas orgánicas, que pueden incluir moléculas organometálicas, moléculas inorgánicas, secuencias genéticas, etc. Un aspecto importante de la divulgación es la evaluación de fármacos candidatos, incluyendo pruebas de toxicidad; y similares.
- 25 **[0102]** Además de los agentes biológicos complejos, los agentes candidatos incluyen moléculas orgánicas que comprenden grupos funcionales necesarios para interacciones estructurales, en particular enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, frecuentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales mencionados. Los agentes candidatos también se encuentran entre las biomoléculas, incluyendo péptidos, polinucleótidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.
- 30 **[0103]** Se incluyen medicamentos farmacológicamente activos, moléculas genéticamente activas, etc. Los compuestos de interés incluyen agentes quimioterapéuticos, hormonas o antagonistas hormonales, etc. Ejemplos de agentes farmacéuticos adecuados para esta invención son los descritos en, "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Goodman y Gilman, McGraw-Hill, Nueva York, Nueva York, (1996), Novena edición, en las secciones: Agua, sales e iones; Fármacos que afectan a la función renal y al metabolismo electrolítico; Fármacos que afectan a la función gastrointestinal; Quimioterapia de las enfermedades microbianas; Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas; Fármacos que actúan sobre los órganos hematopoyéticos; Hormonas y antagonistas hormonales; Vitaminas, Dermatología y Toxicología. También se incluyen las toxinas y los agentes de guerra biológica y química; véase, por ejemplo, Soman, S.M. (Ed.), "Chemical Warfare Agents", Academic Press, Nueva York, 1992).
- 35 **[0104]** Los compuestos de prueba incluyen todas las clases de moléculas descritas anteriormente, y pueden comprender además muestras de contenido desconocido. De interés son las mezclas complejas de compuestos naturales derivados de fuentes naturales como las plantas. Aunque muchas muestras comprenderán compuestos en solución, también pueden analizarse muestras sólidas que puedan disolverse en un disolvente adecuado. Las muestras de interés incluyen muestras medioambientales, p. ej., aguas subterráneas, aguas marinas, residuos mineros, etc.; muestras biológicas, p. ej., lisados preparados a partir de cultivos, muestras de tejidos, etc.; muestras de fabricación, p. ej., el transcurso del tiempo durante la preparación de productos farmacéuticos; así como bibliotecas de compuestos preparados para su análisis; y similares. Las muestras de interés incluyen compuestos cuyo valor terapéutico potencial se está evaluando, es decir, candidatos a fármacos.

- 5 [0105] El término "muestras" también incluye los fluidos descritos anteriormente a los que se han añadido componentes adicionales, por ejemplo, componentes que afectan a la fuerza iónica, el pH, la concentración total de proteínas, etc. Además, las muestras pueden tratarse para lograr al menos un fraccionamiento o concentración parcial. Las muestras biológicas pueden almacenarse si se tiene cuidado de reducir la degradación del compuesto, p. ej., bajo nitrógeno, congeladas o una combinación de ambos. El volumen de muestra utilizado es suficiente para permitir una detección mensurable, por lo general de alrededor de 0,1 a 1 ml de una muestra biológica es suficiente.
- 10 [0106] Los compuestos, incluidos los agentes candidatos, se obtienen de una amplia variedad de fuentes, incluidas las bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se dispone de numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluidas las biomoléculas, incluida la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorios. Alternativamente, se dispone de bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales, o se pueden producir fácilmente. Además, las bibliotecas y compuestos naturales o producidos sintéticamente se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden utilizarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales.
- 15 [0107] La actividad biológica de los agentes se comprueba añadiendo el agente a por lo menos una y normalmente a una pluralidad de muestras celulares, normalmente junto con células que carecen del agente. Se mide el cambio de los parámetros en respuesta al agente y se evalúa el resultado por comparación con cultivos de referencia, p. ej., en presencia y ausencia del agente, obtenidos con otros agentes, etc.
- 20 [0108] Los agentes se añaden convenientemente en solución, o en forma fácilmente soluble, al medio de las células en cultivo. Los agentes pueden añadirse en un sistema de flujo continuo, como un chorro intermitente o continuo, o alternativamente, añadiendo un bolo del compuesto, individualmente o de forma incremental, a una solución que de otro modo sería estática. En un sistema de flujo continuo, se utilizan dos fluidos, uno de los cuales es una solución fisiológicamente neutra y el otro es la misma solución con el compuesto de ensayo añadido. Se pasa el primer fluido sobre las células, seguido del segundo. En el método de solución única, se añade un bolo del compuesto de ensayo al volumen de medio que rodea a las células. Las concentraciones globales de los componentes del medio de cultivo no deben cambiar significativamente con la adición del bolo, o entre las dos soluciones en un método de flujo continuo.
- 25 [0109] Las formulaciones de agentes preferidas no incluyen componentes adicionales, como conservantes, que puedan tener un efecto significativo en la formulación global. Así, las formulaciones preferidas consisten esencialmente en un compuesto biológicamente activo y un portador fisiológicamente aceptable, p. ej., agua, etanol, DMSO, etc. Sin embargo, si un compuesto es líquido sin disolvente, la formulación puede consistir esencialmente en el propio compuesto.
- 30 [0110] Se puede realizar una pluralidad de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Como se sabe en la técnica, para determinar la concentración efectiva de un agente se suele utilizar un rango de concentraciones resultante de diluciones 1:10, u otra escala logarítmica. Las concentraciones pueden afinarse aún más con una segunda serie de diluciones, si es necesario. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección del agente o a la concentración de agente que no da un cambio detectable en el fenotipo.
- 35 [0111] Pueden utilizarse varios métodos para cuantificar la presencia de los marcadores seleccionados. Para medir la cantidad de una molécula que está presente, un método conveniente es marcar una molécula con una fracción detectable, que puede ser fluorescente, luminiscente, radiactiva, enzimáticamente activa, etc., en particular una molécula específica para unirse al parámetro con alta afinidad. Las moléculas fluorescentes están disponibles para marcar prácticamente cualquier biomolécula, estructura o tipo de célula. Las moléculas inmunofluorescentes pueden dirigirse para que se unan no sólo a proteínas específicas, sino también a conformaciones específicas, productos de escisión o modificaciones de sitios como la fosforilación. Es posible diseñar péptidos y proteínas individuales para que sean autofluorescentes, p. ej., expresándolos como quimeras de proteína verde fluorescente en el interior de las células (para una revisión, véase Jones et al. (1999) Trends Biotechnol. 17(12):477-81). Así, los anticuerpos pueden modificarse genéticamente para que incorporen un colorante fluorescente en su estructura. Dependiendo de la etiqueta marcación, los parámetros pueden medirse con marcaciones distintas de las fluorescentes, utilizando técnicas de inmunoensayo como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunoensayos enzimáticos homogéneos y técnicas no enzimáticas relacionadas. La cuantificación de ácidos nucleicos, especialmente ARN mensajeros, también es un parámetro de interés. Pueden medirse mediante técnicas de hibridación que dependen de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico. Las técnicas incluyen métodos de reacción en cadena de la polimerasa, así como técnicas de matrices de genes. Véase Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 2000; Freeman et al. (1999) Biotechniques 26(1):112-225; Kawamoto et al. (1999) Genome Res 9(12):1305-12; y Chen et al. (1998) Genomics 51(3):313-24, por ejemplo.

65 Agotamiento de AMLSC

- [0112] El agotamiento de las AMLSC es útil en el tratamiento de la AML. El agotamiento puede lograrse por varios

métodos. El agotamiento se define como una reducción de la población objetivo de hasta un 30%, o hasta un 40%, o hasta un 50%, o hasta un 75% o más. Una depleción eficaz suele venir determinada por la sensibilidad de la enfermedad concreta a los niveles de la población diana. Así, en el tratamiento de ciertas afecciones, una reducción de incluso un 20% podría ser beneficiosa.

5

[0113] Se utiliza un agente marcador-específico que reduce específicamente las AMLSC diana para entrar en contacto con la sangre del paciente *in vitro* o *in vivo*, en el que después del paso de contacto, hay una reducción en el número de AMLSC viables en la población diana. Un agente ejemplar para tales fines es un anticuerpo que se une específicamente a un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación en la superficie de la AMLSC diana. Una dosis eficaz de anticuerpos para tal fin es suficiente para disminuir la población diana al nivel deseado, por ejemplo como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos para tales fines pueden tener baja antigenicidad en humanos o pueden ser anticuerpos humanizados.

10

[0114] En un caso, los anticuerpos para reducir la población diana se añaden a la sangre del paciente *in vivo*. En otro caso, los anticuerpos se añaden a la sangre del paciente *ex vivo*. Las microesferas recubiertas con el anticuerpo de interés pueden añadirse a la sangre, las células diana unidas a estas microesferas pueden extraerse de la sangre utilizando procedimientos habituales en la técnica. En un caso, las perlas son magnéticas y se extraen con un imán. Alternativamente, cuando el anticuerpo está biotinilado, también es posible inmovilizar indirectamente el anticuerpo sobre una fase sólida que tenga adsorbida avidina, estreptavidina o similares. La fase sólida, normalmente perlas de agarosa o sefara, se separa de la sangre mediante una breve centrifugación. Múltiples métodos para marcar anticuerpos y eliminar dichos anticuerpos y cualquier célula unida a los anticuerpos son rutinarios en el arte. Una vez alcanzado el grado de depleción deseado, se devuelve la sangre al paciente. La depleción de las células diana *ex vivo* disminuye los efectos secundarios, como las reacciones a la infusión, asociados a la administración intravenosa. Una ventaja adicional es que el repertorio de anticuerpos disponibles se amplía considerablemente, ya que este procedimiento no tiene por qué limitarse a anticuerpos con baja antigenicidad en humanos o anticuerpos humanizados.

20

25

[0115] En algunas realizaciones, los anticuerpos para la depleción son anticuerpos biespecíficos. "Anticuerpo biespecífico" y "anticuerpos biespecíficos", también conocidos como anticuerpos bifuncionales, se refiere a anticuerpos que reconocen dos antígenos diferentes en virtud de poseer al menos un primer sitio de combinación de antígenos específico para un primer antígeno o hapteno, y al menos un segundo sitio de combinación de antígenos específico para un segundo antígeno o hapteno. Dichos anticuerpos pueden producirse por métodos de ADN recombinante o incluir, entre otros, anticuerpos producidos químicamente por métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos biespecíficos incluyen todos los anticuerpos o conjugados de anticuerpos, o formas poliméricas de anticuerpos que son capaces de reconocer dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos que han sido reducidos y reformados para conservar sus características bivalentes y a anticuerpos que han sido acoplados químicamente para que puedan tener varios sitios de reconocimiento de antígeno para cada antígeno.

30

40

[0116] Los anticuerpos biespecíficos para su uso en los métodos de la presente invención se unen a al menos uno de los antígenos AMLSC descritos en el presente documento, y pueden unirse a dos o más antígenos AMLSC descritos en el presente documento. Las combinaciones de antígenos de interés incluyen, sin limitación, CD47 + CD96, CD47 + CD99, CD47 + Tim3, CD47 + CD97. En algunas realizaciones, una especificidad del anticuerpo tiene una afinidad baja, p. ej., menos de aproximadamente 10^{-9} constante de unión, normalmente menos de aproximadamente 10^{-8} constante de unión, y puede ser más de aproximadamente 10^{-7} constante de unión.

45

50

55

[0117] Los anticuerpos adecuados para practicar los métodos de la divulgación son preferiblemente monoclonales y multivalentes, y pueden ser anticuerpos humanos, humanizados o químicos, que comprenden anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, y/o fragmentos de unión de cualquiera de los anteriores. En ciertos casos, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos humanos de unión a antígeno de la presente divulgación e incluyen, entre otros, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena simple, Fvs ligados a disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio V_L o V_H. Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, incluidos los anticuerpos de cadena simple, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH₁, CH₂, CH₃ y CL. También se incluyen en la divulgación los fragmentos de unión a antígeno que comprenden cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región bisagra, dominios CH₁, CH₂, CH₃ y CL. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, murinos (p. ej., ratón y rata), asno, oveja, conejo, gol, cobaya, camélido, caballo o pollo. Tal como se utilizan aquí, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas, de células B humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas.

60

65

[0118] Los anticuerpos adecuados para practicar los métodos de la presente divulgación pueden ser biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Además, los anticuerpos de la presente divulgación pueden tener bajo riesgo de toxicidad contra granulocitos (neutrófilos), células NK y células CD4⁺ como células transeúntes.

[0119] Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares inmunoglobulina de cadena pesada-cadena ligera, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539

(1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que suele realizarse mediante pasos de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se describen en WO 5 93/08829, y en Traunecker et al, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

[0120] Según otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Dichas interfaces pueden comprender al menos una parte del dominio CH_3 de un dominio constante de anticuerpo. En este 10 método, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (p. ej., tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (p. ej., alanina o treonina). Esto 15 proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, como los homodímeros. Un método alternativo vincula dos regiones variables de cadena simple diferentes al antígeno termoestable (HSA). El uso de HSA como enlazador aumenta la semivida sérica y tiene la ventaja de su baja inmunogenicidad.

[0121] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los 20 anticuerpos del heteroconjugado puede acoplarse a avidina y el otro a biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario contra células no deseadas (Pat. de EE. UU. Nº 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por HIV (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes reticulantes adecuados son bien conocidos en la técnica, y se divultan en Pat. de EE. UU. Nº 4.676.980, junto con una serie de 25 técnicas de reticulación.

[0122] También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de 30 anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse mediante enlace químico. Brennan et al., Science, 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')_2 . Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante ditiol arsénito sódico para estabilizar los ditióles vicinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados del tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados $\text{Fab}'\text{-TNB}$ se 35 reconvierte al $\text{Fab}'\text{-tiol}$ mediante reducción con mercaptoet-hilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado $\text{Fab}'\text{-TNB}$ para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0123] También se han descrito varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente 40 a partir de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kos-telny et al., J. Immunol, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se volvieron a oxidar para 45 formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un 50 enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígenos. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos 55 de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena simple (sFv). See Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe en Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($\text{V}_\text{H}\text{-CH}_1\text{-V}_\text{H}\text{-CH}_1$) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

[0124] En el contexto de la presente invención, se entiende que los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales y 60 anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab y F(ab')_2), anticuerpos químéricos, anticuerpos bifuncionales o biespecíficos y complejos de anticuerpos tetraméricos. Se entiende que los anticuerpos son reactivos contra un antígeno seleccionado en la superficie de una célula T si se unen con una afinidad adecuada (constante de asociación), p. ej., mayor o igual a 10^7M^{-1} . Además, los anticuerpos que pueden usarse en los métodos de la presente divulgación también pueden describirse o especificarse en términos de sus afinidades de unión incluyen aquellos con una constante de disociación o Kd inferior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-9} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, 10^{-15} M.

[0125] Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales y los fragmentos pueden ser examinados 65 para su utilidad de la misma manera que se ha descrito anteriormente para los anticuerpos enteros. Por ejemplo, pueden

generarse fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro y producir fragmentos Fab'.

5 [0126] La invención también contempla derivados de anticuerpos quiméricos, es decir, moléculas de anticuerpos que combinan una región variable de animal no humano y una región constante humana. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón, rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se han descrito diversos enfoques para fabricar anticuerpos quiméricos que pueden utilizarse para fabricar anticuerpos quiméricos que contengan la región variable de inmunoglobulina que reconoce los antígenos seleccionados en la superficie de células diferenciadas o células tumorales. Véase, por ejemplo, Morrison et al., 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81,6851; Takeda et al., 1985, Nature 314:452; Cabilly et al., Pat. de EE. UU. Nº. 4,816,567; Boss et al., Pat. de EE. UU. Nº. 4,816,397; Tanaguchi et al., Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B.

10 15 [0127] La conjugación química se basa en el uso de reactivos homo- y heterobifuncionales con grupos E-amino o grupos tiol de región bisagra. Los reactivos homobifuncionales como el 5,5'-Ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)(DNTB) generan enlaces disulfuro entre los dos Fabs, y la 0-fenilendimaleimida (O-PDM) genera enlaces tioéter entre los dos Fabs (Brenner et al., 1985, Glennie et al., 1987). Los reactivos heterobifuncionales como el N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) combinan grupos amino expuestos de anticuerpos y fragmentos Fab, independientemente de su clase o isotipo (Van Dijk et al., 1989).

20 25 [0128] Los anticuerpos de la divulgación, es decir, los anticuerpos que son útiles para tratar cánceres, así como otros cánceres que comprenden células madre cancerosas que expresan antígenos establecidos en la Tabla 1, incluyen derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de tal manera que la unión covalente no impide que el anticuerpo se una a los antígenos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados, p. ej., por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

30 35 [0129] Se pueden proporcionar kits, donde el kit comprenderá reactivos de tinción que son suficientes para identificar diferencialmente las AMLSC descritas en el presente documento. Una combinación de interés puede incluir uno o más reactivos específicos para un marcador o combinación de marcadores de la presente divulgación, y puede incluir además anticuerpos específicos para CD96, CD34 y CD38. Los reactivos de tinción son preferiblemente anticuerpos, y pueden estar marcados de forma detectable. Los kits también pueden incluir tubos, tampones, etc., e instrucciones de uso.

40 [0130] Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies animales o géneros y reactivos particulares descritos, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

45 [0131] Tal como se utilizan aquí, las formas singulares "un/una", y "el/la" incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el cultivo" incluye la referencia a uno o más cultivos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende para un experto en la materia a la que pertenece esta invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

EXPERIMENTAL

Ejemplo 1

Identificación de moléculas de superficie celular expresadas preferentemente en células madre humanas de leucemia mieloide aguda en comparación con sus homólogas normales

55 [0132] *Identificación Prospectiva de un Progenitor Multipotente Humano, la Célula de Origen de las LSC de AML.* La identificación de las moléculas de superficie celular que se expresan preferentemente en las LSC de AML se facilitaría enormemente determinando la célula dentro de la jerarquía hematopoyética normal que sufre la transformación para convertirse en una LSC de AML. La opinión predominante en este campo ha sido que las LSC de AML surgen de las células madre hematopoyéticas (HSC), ya que ambas poblaciones de células madre están enriquecidas en células Lin-CD34+CD38-. Sin embargo, se ha demostrado que las HSC humanas expresan CD90, mientras que las LSC de AML son CD90-. Además, se observó que las HSC de pacientes con AML t(8;21) en remisión a largo plazo contenían el producto de la translocación AML1-ETO, lo que sugiere que las HSC eran preleucémicas y que la transformación completa en LSC de AML se produjo en un progenitor posterior.

65 [0133] Aunque es ciertamente posible que las HSC sean de hecho la célula de origen de las LSC de AML, y que estas células pierdan la expresión de CD90 como consecuencia de la transformación, también es posible que las LSC de AML

se originen de células Lin-CD34+CD38-CD90- descendentes. Hemos utilizado un modelo de xenotrasplante en recién nacidos NOD/SCID/IL-2R gamma null (NOG) para evaluar la función de las subpoblaciones de sangre de cordón Lin-CD34+CD38-, identificadas en función de la expresión de CD90 y CD45RA. Las células Lin-CD34+CD38-CD90+ produjeron un injerto multilineal a largo plazo y formaron trasplantes secundarios satisfactorios, por lo que contenían HSC. 5 El trasplante de células purificadas Lin-CD34+CD38-CD90-CD45RA- dio lugar a niveles más bajos de injerto multilineal en receptores primarios, y a una capacidad reducida estadísticamente significativa de formar trasplantes secundarios a largo plazo. De hecho, con el trasplante de 50 células purificadas, estas células no consiguieron injertarse a largo plazo, a diferencia de las HSC Lin-CD34+CD38-CD90+. Así pues, las células Lin-CD34+CD38-CD90-CD45RA- son 10 multipotentes y poseen una capacidad de autorrenovación limitada. Estas células se denominan progenitores multipotentes (MPP) y representan la posible célula de origen de las LSC de AML.

15 [0134] *Uso de Perfiles de Expresión Génica para Identificar Moléculas de Superficie Celular Preferentemente Expresadas en LSC de AML Comparadas con sus Contrapartes Normales, HSC y MPP.* Las moléculas de superficie celular que se expresan preferentemente en las células madre humanas de la leucemia mieloide aguda (LSC de AML) en comparación con sus homólogas normales tienen aplicaciones terapéuticas que se describen a continuación. Una estrategia para identificar estas moléculas ha consistido en generar perfiles de expresión génica de las LSC de AML y de las HSC y MPP normales, y compararlos en busca de genes expresados de forma diferencial.

20 [0135] HSC y MPP de médula ósea normal (n=4) y LSC de AML (n=9) fueron purificadas por FACS. Se preparó ARN total, se amplificó y se hibridó en micromatrices de ADN humano de Affymetrix. El análisis estadístico identificó 4037 genes expresados diferencialmente entre HSC y LSC, y 4208 genes expresados diferencialmente entre MPP y LSC, con p<0,05 y una Tasa de Falsos Descubrimientos del 5% (Figura 1A). La investigación de estos genes expresados diferencialmente identificó 288 y 318 moléculas de superficie celular expresadas preferentemente en LSC de AML en al menos 2 veces en comparación con HSC y MPP, respectivamente. Se indican algunos miembros seleccionados de esta 25 lista, incluidos muchos con la mayor expresión preferente en LSC de AML (Figura 1B, Tabla 1).

Tabla 1

Cambio de fold	Genbank	Símbolo genético	Descripción
94,34	M27331	TRGC2	Receptor de células T gamma constante 2
57,47	NM_005816	CD96	Antígeno CD96
47,17	A1862120	MAMDC2	Dominio MAM que contiene 2
32,36	AF348078	SUCNR1	receptor 1 de succinato
32,05	M16768	TRGC2	Receptor de células T gamma constante 2

40

45

50

55

60

65

(continuación)

	Cambio de fondo	Genbank	Símbolo genético	Descripción
5	30,96	NM_002162	IL1RAP	proteína accesoria del receptor de interleucina 1
	39,85	M13231	TRGC2	Receptor de células T gamma constante 2
	27,56	NM_003382	TYROSP	Proteína de unión a la proteína tirosina quinasa TYRO
	28,88	NM_004271	LY96	antígeno linfocitario 96
10	20,96	NM_014879	P2RY14	receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 14
	18,38	BC020749	CD96	Antígeno CD96
	18,39	NM_006048	PTHR2	receptor 2 de la hormona paratíroides
15	17,73	AI825747	ADR81	Adrenérgico, beta-1, receptor
	17,36	NM_016376	RASGRP3	Proteína liberadora de guanilo RAS 3 (regulada por calcio y DAG)
	16,84	U68027	C3AR1	componente complementario 3a receptor 1
20	14,49	AW025572	HAVCR2	virus de la hepatitis A receptor celular 2
	12,48	AF285447	HDST	transductor de señal de células hematooyectivas
	11,92	AI805323	LGR7	Receptor 7 acoplado a proteínas G que contiene repeticiones rico en leucina
25	11,87	NM_001197	BIK	Asesino que interactúa con BCL2 (inductor de apoptosis)
	11,53	NM_018092	NETO2	neuromelina (NRP) y tollcide (TLL) 2
	11,07	N74807	AQP3	aquaporin 3
	10,88	BF439675	CD69	Antígeno CD69 (p60, antígeno de activación temprana de células T)
30	10,48	NM_001769	CD8	Antígeno CD8 (p24)
	10,32	AF167243	IL1RAP	proteína accesoria del receptor de interleucina 1
35	9,52	AA814140	C5orf118	marco de lectura abierto 18 del cromosoma 5
	8,77	NM_005582	CD180	Antígeno CD180
	7,46	AF039686	GPR34	Receptor 34 acoplado a proteínas G
	7,30	AI056778	ITGAX	integrina, alfa 6
40	7,19	AJ277161	TNFRSF4	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 4
	6,99	AI738675	SEPLIG	Selectina P ligando
	6,85	AA888888	PDE3B	Fosfodiesterasa 3B, inhibida por cGMP
	6,80	AU149572	ADCY2	adenilato ciclasa 2 (cerebro)
	5,80	NM_002299	LCT	lactasa
45	5,53	NM_005296	GPR23	Receptor 23 acoplado a proteínas G
	5,45	NM_004106	FCER1G	Fc fragmento de IgE, receptor de alta afinidad
	5,29	AI741058	SEPLIG	selectina P ligando
	5,25	AW406568	MGC15519	
	5,08	M61698	ITGAX	integrina alfa X
50	5,02	NM_003494	DYSF	dystefina
	5,86	AI860212	PAG1	fosfoproteína asociada a microdominios de glucosfingolípidos 1
	5,75	NM_013447	EMR2	módulo tipo egf que contiene, tipo mucina, tipo receptor de hormona 2
55	5,62	NM_017806	LIMA1	Adaptador transmembrana interactivo Lck 1
	5,62	AK592824	AMN	Homólogo sin amíos (ratón)
	5,59	AF345067	GPR174	Receptor 174 acoplado a proteínas G
	5,29	BC041828	IL1RAP	Proteína accesoria del receptor de interleucina 1
	5,26	L03419	FCGR1A	Fc fragmento de IgG, receptor de alta afinidad 1a (CD64); Fc receptor gamma 1 B2
	5,24	SG230506	SLC7A6	familia portadora de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiônicos, sistema y +), miembro 6
	5,18	AF015524	CCR5	quimiotaxina (mrólo CC) tipo receptor 2
	5,13	AA831143	SLC45A3	familia portadora de solutos 45, miembro 3
	5,10	AJ240686	TRAT1	Adaptador transmembrana asociado a receptor de células T 1
	5,08	AW183030	GPR92	Receptor 92 acoplado a proteínas G
	5,03	NM_002120	HLA-DQB	complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DQ beta
60	5,03	NM_015364	LY96	linfocito antígeno 96
	4,93	NM_020399	GOPO	PDZ asociado a Golgi y motivo de basina en espiral que contiene

(continuación)

	Cambio de sentido	Genbank	Símbolo genético	Descripción
5	4.88	AK026133	SEMA4B	semáforina
	4.88	BC041654	VMD2	distrofia macular vitíligo forma 2
	4.85	NM_152592	C14orf49	marco de lectura abierto 49 del cromosoma 14
	4.85	AA923524	RASGRP4	Proteína liberadora de quinolí RAS 4
	4.85	BC008777	ITGAL	integrina, alfa L1
10	4.87	AF014403	PPAP2A	Ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2A
	4.65	AK097698	SORCS2	Domino VPS10 relacionado con Sortilin que contiene el receptor 2
	4.63	X14358	FCGR1A	Fc fragmento de IgG, alta afinidad al receptor (CD64)
	4.55	NM_001623	ALOX5AP	proteína activadora de 5-lipoxigenasa de araquidonato
	4.80	AU1155868	C18orf11	marco de lectura abierto 1 del cromosoma 18
15	4.44	AK075082	HERV-FRD	Proteína HERV-FRD ancestral Env poliproteína
	4.42	NM_0220963	GPR107	Receptor 107 acoplado a proteínas G
	4.37	BC003039	FAM268	familia con similitud de secuencia 26, miembro 8
	4.35	NM_153761	IL12RB1	receptor de interleucina 12, beta 1
	4.35	A7762344	PTGER1	receptor 1 de prostaglandina E EP1), 42 kDa
20	4.31	NM_006459	SPPN1	Familia de dominio SPPH, miembro 1
	4.27	NM_003128	SPTA1	espectrina, alfa, entropéptido 1 (elastosclerosis 2)
	4.22	AL516381	AQP1	aqüaporina 1 (proteína formadora de canales, 28 kDa)
	4.12	AK026188	PODHGC3	subfamilia C de protocadherina gamma
	4.10	AU146683	EDG2	Diferenciación endotelial, receptor acoplado a la proteína G del ácido lisofatídico, 2
25	4.05	BE673587	SLC14A1	Familia portadora de solutos 14 (transportador de urea), miembro 1 (grupo sanguíneo Kidd)
	4.02	BF123963	TSPAN2	tetraspanina 2
	4.00	AW242272	KCNKS	Canal de potasio, subfamilia K, miembro 5
	3.98	TS8858	DHRS3	Miembro 3 de deshidrogenasa/reductasa (familia SDR)
30	3.94	A1827849	VTN1A	Transporte de vesículas a través de la interacción con t-SNARE homóloga 1A (nevadura)
	3.86	AL134012	NRXN2	Neurexina 2
	3.83	BF0230814	CD47	Antígeno CD47
	3.80	A1869717	MGC15523	MGC15523
	3.80	AM58583	SIMP	Fuente de péptidos inmunodominantes asociados a MHC
	3.79	NM_002183	IL3RA	receptor de interleucina 3, alfa (baja afinidad)
	3.79	AA606620	NPXN2	neurexina 2
	3.73	NM_0012036	IL3RG	receptor de interleucina 2
	3.72	BC002737	VAMP2	synaptobrevin 2
40	3.72	BC006884	BID	Agonista de la muerte del dominio que interacciona BH3; BH3 interactuando dominio agonista de la muerte
	3.68	A1688418	PLXNA2	plexina A2
	3.68	BC003105	PTP4A3	proteína tirosina fosfatasa tipo IVA, miembro 3
	3.68	NM_001772	CD33	Antígeno CD33 (gp67)
45	3.65	BC007524	SPAG9	espermatozoide antígeno 9
	3.64	AK044200	SLC25A35	portador de solutos familia 25, miembro 35
	3.64	BC006253	KLHL20	kelch-like 20 (Drosophila)
	3.60	A1335263	NETO2	neuropilina (NRP) y tollídeo (TLL) 2
	3.58	BF381837	C20orf52	marco de lectura abierto 52 del cromosoma 20
	3.51	NM_0028866	RAP2A	RAP2A
50	3.50	NM_087083	TBC1D8	Familia de dominio TBC1, miembro 8 (con dominio GRAM)
	3.45	AK027160	SCL2L11	SCL2-like 11 (facilitador de apocalosis)
	3.44	BF055366	EDG2	diferenciación endotelial, receptor acoplado a la proteína G del ácido lisofatídico, 2
	3.42	NM_0036068	GPR65	Receptor 65 acoplado a proteínas G
	3.41	A1875453	PLXNA3	plexina A3
	3.40	AV734194	DPP8	dipeptidilpeptidasa 8
	3.38	BC000232	C5orf18	marco de lectura abierto 18 del cromosoma 5
	3.36	BC001956	KIAA1961	Gen KIAA1961

(continuación)

	Cambio de fold	GenBank	Símbolo genético	Descripción
5	3.34	NM_013332	HKG2	proteína 3 inducible por hipoxia
10	3.31	BC029450	SLC33A1	Familia de transportistas de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1
15	3.30	AW008585	C18orf1	marco de lectura abierto 1 del cromosoma 18
20	3.29	BF693956	CD47	Antígeno CD47
25	3.28	BF677966	KIAA1961	Gen KIAA1961
30	3.27	AI433691	CACNA2D4	canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad alfa 2/delta 4
35	3.26	AB014573	NPHP4	neurofibrosis 4
40	3.25	AL582004	LY9	antígeno linfocitario 9
45	3.26	BC0236280	CD86	Antígeno CD86
50	3.24	AA638289	SLC26A7	Portador de solutos familia 26, miembro 7
55	3.24	NM_005211	CSF1R	receptor de factor estimulante de colonias 1
60	3.24	AI051254	TRPM2	canal de catión potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 2
65	3.23	AW292816	A6H02	dominio de abhidrolasa que contiene 2
70	3.23	BC040275	RASGRF1	Factor de liberación de nucleótidos de guanina específica de proteína Ras 1
75	3.22	NM_021911	GABRB2	receptor de ácido gamma-aminobutyrico (GABA) A, beta 2
80	3.19	AI860619	SLC7A6	familia portadora de solutos 7 (transportador de aminoácidos cationicos, sistema y +), miembro 6
85	3.19	NM_001860	SLC31A2	familia de transportistas de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 2
90	3.18	NM_015880	C2orf24	marco de lectura abierto 24 del cromosoma 2
95	3.17	AW058610	SLC36A1	familia portadora de solutos 36
100	3.16	AI145049	HIP1	Huntingtin que interacciona con la proteína 1
105	3.15	NM_005770	SENP2	pequeño factor 2 rico en EDRK
110	3.15	NM_003566	EEA1	Antígeno endosómico precoz 1, 162 kD
115	3.14	NM_020041	SLC2A8	portador de solutos familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 9
120	3.14	WNK7118	SLC24A4	familia portadora de solutos 24
125	3.13	AI823165	TIKAM2	molécula adaptadora Gαi receptor tipo sol 2
130	3.12	AI874647	SPPL2A	péptido señal similar a peptidasa 2A
135	3.11	NM_004121	GGTLA1	actividad similar a la gamma-glutamiltransferasa 1
140	3.10	NM_004546	NDUFB2	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 2, 8kDa
145	3.05	X15786	JUBILADO	protooncogen ret (neoplasia endocrina múltiple y carcinoma medular de tiroides 1, enfermedad de Hirschsprung)
150	3.05	AF181660	MP2L1	proteína de mielina cercano como 1
155	3.05	BG230614	CD47	Antígeno CD47 (antígeno relacionado con Rh, transductor de señal asociado a integrina)
160	3.00	AI871998	STAM2	molécula adaptadora de transducción de señal (dominio SH3 y motivo ITAM) 2
165	2.99	NM_000201	ICAM1	molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor de linfocito humano
170	2.93	NM_028244	TSGA10	testículo específico, 10
175	2.93	AI147538	PRKCE	Proteína quinasa C, epsilon
180	2.92	NM_024576	OGFR1	factor de crecimiento opioide tipo receptor 1
185	2.91	AI248055	ABCC4	Casette de unión a ATP, subfamilia C (CFTR/MRP), miembro 4
190	2.86	AAS03877	CEPT1	Colina/estanolamina fosfotransferasa 1
195	2.84	BC030993	FLJ21127	Proteína hipotética FLJ21127
200	2.82	AA829818	LY86	Antígeno linfocitario 86
205	2.82	NM_001859	SLC31A1	familia de transportistas de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 1
210	2.81	M74721	CD79A	Antígeno CD79A (alfa asociado a inmunoglobulina)
215	2.79	AI866112	MGAT4B	Manosito (alfa-1,3-) glicoproteína beta-1,4-N acetilglucosaminotransferasa, isoenzima B

(continuación)

Cambio de fold	Genbank	Símbolo genético	Descripción
5	2.79 NM_030930	UNC80B1	unc-80 homólogo B1 (<i>C. elegans</i>); homólogo de la unc-80 (<i>C. elegans</i>)
	2.79 X74038	PLAUR	activador de plasminógeno, receptor de uroquinasa
	2.78 SF514281	LY86	Linfocito antigen 86
	2.75 BC005253	KLHL20	kelch-like 20 (<i>Drosophila</i>)
	2.73 AB036432	AGER	receptor de glicosilación avanzada específica del producto final
10	2.71 NM_007246	ATKN2L	tipo ataxina 2
	2.71 NM_016072	GOLT1B	Golgi transporta 1 homólogo B (<i>S. cerevisiae</i>)
	2.71 AI853548	ZCHHC8	dedo de zinc, tipo CHHC que contiene 8
	2.70 AI836233	TMEM8	proteína transmembrana 8 (cinco dominios que abarcan la membrana)
	2.69 BE502509	TGJAM	TNFAF3 interactuando con la proteína 3
15	2.68 AW117785	PEX13	factor de biogénesis peroxisoma 13
	2.68 AW002216	IL17RB	Receptor de interleucina 17 B
	2.67 NM_003853	IL18RAP	proteína accesoria del receptor de interleucina 18
	2.66 NM_002490	NDUFA8	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alta, 8, 14kDa
	2.65 NM_016939	TNFRSF12A	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 12A
20	2.65 AI833185	FLJ20255	Proteína higrofílica FLJ20255
	2.65 NM_053931	SLAMF6	Miembro de la familia SLAM 6
	2.65 AWS71669	TNFRSF19L	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro tipo 19
	2.64 AA854142	CEECAM1	molécula de adhesión celular endotelial cerebral 1
	2.62 AW510783	TMEM83A	proteína transmembrana 83A
25	2.61 W93607	ACSL4	Acil-CoA sintetasa miembro de la familia de cadena larga 4
	2.60 S78475	NTRK3	brassina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3
	2.60 AJ130713	SIGLEC7	lectina 7 similar a la que se une al ácido sálico
	2.66 NM_003776	EDG8	diferenciación endotelial, receptor 8 acoplado a proteína G
	2.65 AI870986	MAMDC4	Dominio MAM que contiene 4
30	2.64 AF010447	MRI	complejo principal de histocompatibilidad, relacionado con la clase I
	2.64 NM_008068	TLR8	receptor 8 tipo pieza
	2.59 AF041811	NTRK3	brassina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3
	2.63 AW853521	SERF2; HYPK	pequeño factor 2 rico en EDRK; Huntingtona interactuando con la proteína K
	2.61 AW293276	CD53	Antígeno CD53
35	2.48 AK023053	PLXNA2	Plexina A2
	2.48 AI126204	C6orf128	marco de lectura abierto del cromosoma 6 128
	2.49 NM_000392	ABCC2	Casette de unión a ATP, subfamilia C (CFTR/MRP), miembro 2
	2.48 BC032474	TIRAP	tol-interdisuán 1 receptor (TIR) dominio que contiene proteína adaptadora
	2.44 NM_031211	IMAA	Pseudogen SLC7A5
40	2.44 AI797836	CD8	Antígeno CD8 (p56-62)
	2.41 WT2002	C1QOR1	componente complementario 1
	2.40 AA705616	DPP9	dipeptidipeptidasa 9
	2.40 BM987094	DLGAP4	discos, proteína 4 grande (<i>Drosophila</i>) asociada al homólogo
	2.40 AL713719	LOC283561	ATPasa, clase VI, tipo 11A
45	2.39 AI628734	PPLR	receptor de prolactina
	2.39 NM_012110	CHIC2	dominio hidrofílico rico en cisteína 2
	2.38 AM029002	TFR2	receptor de transferina 2
	2.37 NM_001555	KGSF1	superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 1
	2.36 AA426091	C19orf15	marco de lectura abierto del cromosoma 19 15
50	2.36 BE547542	GOPC	PDZ asociado a Golgi y motivo de bobina en espiral que contiene
	2.36 NM_004231	ATP6V1F	ATPasa, transporte H +, lisosomal 14kDa, subunidad V1 F
	2.36 AJ130712	SIGLEC7	lectina 7 similar a la que se une al ácido sálico
	2.36 NM_017905	TMCO3	dominios transmembrana y en espiral 3

60

65

(continuación)

	Cambio de fold	Genbank	Símbolo genético	Descripción
5	2.35	AB504885	CACNB1	canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad beta 1
	2.35	NM_006003	NDUFA81	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1, subcomplejo alfa/beta, 1, 8kDa
	2.35	NM_001251	CD68	Antígeno CD68
10	2.35	AA700869	PSCD2	Homología de Pleckstrin, Sec7 y dominios en espiral 2 (catehesina 2)
	2.35	U84903	CD44	Antígeno CD44 (función de referencia y sistema de grupo sanguíneo indio)
15	2.35	NM_003641	TNFRSF10C	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10c, señalero sin dominio intracelular
	2.35	NM_004541	NDUFA1	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 1, 7.5kDa
	2.35	BE567130	KLRK1	Subfamilia K del receptor tipo lectina de células asesinas, miembro 1
20	2.31	NM_017460	CYP3A4	citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4
	2.31	AI339536	DSC1	Desmocilin 1
	2.31	NM_001783	CD79A	Antígeno CD79A (alfa asociado a inmunoglobulina), antígeno (alfa asociado a inmunoglobulina)
25	2.30	AA333161	VTI1A	Transporte de vesículas a través de la interacción con t-SNARE homólogo 1A (envasado)
	2.30	AW134823	CD6	Antígeno CD6; Antígeno CD6
	2.30	AI137537	ATP8B2	ATPasa, Clase I, tipo 8B, miembro 2
30	2.29	AI671983	SLC2A9	portador de solutos familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 9
	2.29	AA018167	C22orf3	cromosoma 22 marco de lectura abierto 3
	2.29	AI137415	ADAM33	ADAM dominio metalopeptidasa 33
35	2.29	NM_002688	PCDHNGC3	subfamilia C de protocadherina gamma
	2.29	NM_020980	GPR107	Receptor 107 acoplado a proteínas G
	2.29	AK074635	GENK-3414	Genotetina 1
40	2.28	BE138575	ITGB5	Integrina, beta 5
	2.28	NM_003630	SIGLEC5	lectina 5 de tipo Ig que se une al ácido sialico; lectina 5 de unión a ácido sialico tipo Ig
	2.28	NM_013319	UBIAD1	UbiA dominio prenitransferasa que contiene 1
45	2.28	M63880	FGFR1	receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (fisosina quinasa 2 relacionada con fms, síndrome de Pfeiffer)
	2.27	NB71156	MSCP	Portador de solutos familia 25, miembro 37
	2.27	BC006215	SMEK2	Proteína KIAA1387; Proteína KIAA1387
50	2.27	AI103653	SLTRK2	Familia tipo SLT y NTRK, miembro 2
	2.27	NM_007011	ABHD2	dominio de abhidrolasa que contiene 2
	2.26	AI787210	MGC11332	Proteína hipotética MGC11332
55	2.26	BF723605	NRCAM	Molécula de adhesión celular neuronal
	2.26	R08129	CGA08	Proteína inmunomoduladora de células T
	2.26	AF052059	SEL1L	sel-1 supresor de lin-12 (C. elegans)
60	2.25	NM_005729	PPIF	peptidilproli isomerasa F (ciclofílina F)
	2.25	BE858032	ARL2L1	Factor de ribosilación de GTP-like 2-like 1
	2.25	AI803390	C14orf118	Marco de lectura abierto 118 del cromosoma 14
65	2.24	NM_017767	SLC39A4	portador de solutos familia 39 (transportador de zinc), miembro 4
	2.24	AI138273	SPTAN1	Espectrina, alfa, no entrocitica 1 (alfa-fodrina)
	2.24	AI077680	CGA08	Proteína inmunomoduladora de células T
70	2.23	AA438667	SLC7A11	familia portadora de solutos 7, (transportador de aminoácidos catiônicos, sistema y+) miembro 11
	2.23	NM_000834	IL8RA	receptor de interleucina 8, alfa
	2.22	AI390177	MGC34022	Familia portadora de solutos 44, miembro 5
75	2.21	NM_001531	MR1	complejo principal de histocompatibilidad, relacionado con la clase I

(continuación)

	Cambio de fold	Genbank	Símbolo genético	Descripción
5	2.21	NM_003183	ADAM17	ADAM metalopeptidasa dominio 17 (factor de necrosis tumoral, alfa, enzima convertidora)
	2.20	AC003999	SCAP2	arc fosfoproteína 2 asociada a la familia
	2.20	BC014416	SLC33A1	familia de transportistas de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1
	2.20	AF228731	ADORA3	receptor de adenosina A3
10	2.19	AI608725	ICAM1	molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor de rinovirus humano
	2.19	U41163	SLC6A8; PLJ43865	portador de solutos familia 6 (transportador de neurotransmisores, creatina), miembro 8; similar al transportador de creatina dependiente de sodio y cloruro
15	2.19	AU147799	LRRC15	repetición rica en leucina que contiene 15
	2.18	AW037166	LOC255104	Otros dominios transmembrana y de botina en espiral 4
	2.18	NM_006505	PVR	receptor de poliovirus
	2.18	AI638420	CLIC4	canal intracelular de cloruro 4
20	2.18	AI167482	SCUBE3	Péptido señal doxina CLIC, similares a EGF 3
	2.18	AI729514	HAS3	hialuronano sintasa 3
	2.18	NM_008871	FXYD3	Dominio FXYD que contiene el regulador de transporte de iones 3
	2.17	AI022388	TRAF3IP3	TRAF3 interactuando con la pringleina 3
25	2.17	U90940	FCGR2C	Fc fragmento de IgG, baja afinidad tipo receptor para (CD32)
	2.16	BC023540	SORCS1	Dominio VPF10 relacionado con Sorbin que contiene el receptor 1
	2.16	AY713913	OSTM1	proteína transmembrana asociada a osteopetrosis 1
	2.15	NM_024505	NOX5	NADPH oxidasa, dominio de unión a calcio EF-mano 5
30	2.15	BC006178	SEC22L3	Vesículas SEC22 que trafican con proteínas 3 (S. cerevisiae); Trafico de vesículas SEC22 similar a proteínas 3 (S. cerevisiae)
	2.15	BG151527	GRIK5	receptor de glutamato ionotrópico, kainato 5
	2.14	AW001754	NEGR1	receptor de glicoproteína neuronal 1
	2.14	NM_013979	BNIP1	BCL2-adenovirus E1B 19kDa proteína interactuante 1
35	2.14	NM_018843	TREM1	receptor desconocido expresado en células mieloides 1
	2.12	NM_005284	GPR6	Receptor 6 acoplado a proteínas G
	2.11	AA454190	ZDHHC20	dedo de zinc, tipo DHHC que contiene 20
	2.11	AR048796	TMPRSS13	proteasa transmembrana, serina 13
40	2.11	AI044520	NYD-SP21	testículos relacionados con el desarrollo NYD-SP21
	2.11	BE463930	TMAP1	Hemofagocitosis matricial asociada 7
	2.10	NM_152284	SLC39A13	portador de solutos familia 39 (transportador de zinc), miembro 13
	2.08	AL520874	EPHB2	Receptor de EPH B2
45	2.07	NM_018688	VPS33B	clasificación de proteínas vacuolares 33B (levadura)
	2.07	NM_024531	GPR172A	Receptor 172A acoplado a proteínas G
	2.07	NM_023038	ADAM19	ADAM metalopeptidasa dominio 19 (metrín beta)
	2.07	BC001281	TNFRSF10B	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10b
50	2.07	AF217749	PCDH9	protocadherin beta 9
	2.06	AB030077	FGFR2	receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (quinasa expresada en bacterias), receptor del factor de crecimiento de queratinocitos, disostosis craneofacial 1, síndrome de Crouzon, síndrome de Pfeiffer, síndrome de Jackson-Weiss)
	2.06	AL127422	SUSD1	dominio de sushi que contiene 1
	2.05	NM_004518	KCNQ2	canal dependiente de voltaje de potasio, subfamilia similar a KQT, miembro 2
55	2.04	AI672363	VPS33B	clasificación de proteínas vacuolares 33B (levadura)
	2.04	NM_006671	SLC1A7	portador de solutos familia 1 (transportador de glutamato), miembro 7
	2.03	AA215619	DLGAP1	Discs, proteína grande (Drosophila) asociada al homólogo 1
	2.02	NM_004648	PTPNS1	proteína tirosina fosfatasa, sustrato de tipo no receptor 1

60

65

(continuación)

Cambio de fold	Genbank	Símbolo genético	Descripción
2.02	NM_002584	P2RY2	receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 2
2.01	BF511878	SCUB3	Peptido señal, dominio CUB, similar a EGF 3
2.01	BC013385	CLEC7A	Familia de dominio de lectina de tipo C 7, miembro A

10

Tabla 2

Cambio de fold	Genbank	Símbolo genético	Descripción
5	57.47	NM_005818	CD96
	32.36	AF348078	SLC39A1
	30.95	NM_002182	IL1_RAP
	27.55	NM_003332	TYROBP
	26.88	NM_004271	LY86
	26.95	NM_014873	P2RY14
	18.38	NM_005048	PTHR2
15	17.73	AI625747	ADRB1
	17.38	NM_015376	RASGRP3
	16.84	US2027	C3AR1
	14.49	AW025672	HAVCR2
	12.48	AF285447	HCST
20	11.92	AI808323	LGR7
	11.67	NM_001197	BIK
	11.53	NM_018092	NETO2
	11.07	NT4807	AQP3
	10.48	NM_001769	CD9
	8.77	NM_085882	CD180
25	7.46	AF039686	GPR34
	7.19	AJ277151	TNFRSF4
	6.85	AA888856	PDE3B
	6.80	AU149572	ACOT2
	6.80	NM_002289	LCT
	6.58	NM_085296	GPR23
	6.45	NM_034106	FCER1G
30	6.25	AW405869	MGC15619
	6.06	M81835	ITGAX
	5.82	NM_003494	DYSP
	5.75	NM_013447	EMR2
	5.62	NM_017806	LIME1
	5.62	AN092824	AMN
35	5.50	AF315567	GPR174
	5.26	LO3419	FCGR1A ; LGCA40307
	5.18	AF015824	CCR2
	5.13	AA631143	SLC45A3
	5.10	AJ240195	TRAT1
	5.06	AW183080	GPR92
	5.03	NM_002120	HLA-DQB
40	5.03	NM_015084	LY96
45			

50

Tabla 3

Cambio de fold	Genbank	Símbolo genético	Descripción
55	57.47	NM_005818	CD96
	32.36	AF348078	SLC39A1
	30.95	NM_002182	IL1_RAP
	27.55	NM_003332	TYROBP
	26.88	NM_004271	LY86
	26.95	NM_014873	P2RY14
	18.38	NM_005048	PTHR2
60	17.73	AI625747	ADRB1
	17.38	NM_015376	RASGRP3
	16.84	US2027	C3AR1
	14.49	AW025672	HAVCR2
	12.48	AF285447	HCST
65	11.92	AI808323	LGR7

(continuación)

	Cambio de nucleo	Genbank	Simbolo genetico	Descripcion
5	11,87	NM_0811187	BRK	Asesino que interacciona con BCL2 (inductor de apoptosis)
	11,93	NM_018092	NETO2	neuropilina (NRP) y teloide (TLI) 2
	11,97	N74607	AQPF3	esquepsina 3
	10,88	BF429875	CD69	Antígeno CD69 (p60, antígeno de activación de células T temprano)
	10,48	NM_001769	CD9	Antígeno CD9 (p24)
	9,52	AA814140	C5orf116	marco de lectura abierto 18 del cromosoma 5
	8,77	NM_085623	CD180	Antígeno CD180
	7,46	AF023686	GPR34	Receptor acoplado a proteínas G 34
	7,30	A1056778	ITGAS	Integrina, alfa 6
	7,19	AJ277153	TNFRSF4	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 4
10	6,99	A7398879	SELPLG	Selectina P ligando
	6,85	AA888888	PDE3B	Fosfodiesterasa 3B, inhibida por cGMP
	6,80	AU149572	ADCY2	adenilato ciclase 2 (cerbera)
	6,60	NM_002299	LCT	lactasa
	5,58	NM_005286	GPR23	Receptor 23 acoplado a proteínas G
	5,45	NM_084108	FCER1G	Fc fragmento de IgE, alta afinidad I, receptor para: gamma polipéptido
	5,26	AW408369	MOC15613	proteína hipotética MOC15613
	5,06	MS1695	ITGAX	integrina, alfa X (antígeno CD11C (p150), polipéptido alfa)
	5,92	NM_003494	DYGF	dyferin, distrofia muscular de la cintura escapular 2B (recesiva)
	5,85	A1860212	PAG1	listerina asociada con glucosaminopolíicos microdominios 1
15	5,75	NM_013447	EMR2	marco de lectura abierto que contiene, tipo mucina, tipo receptor de hormona 2
	5,62	NM_017808	LIME1	Adaptador transmembrana interactivo LIM 1
	5,62	AK0302824	AMN	Homólogo sin armón (ratón)
	5,59	AF345567	GPR174	Receptor 174 acoplado a proteínas G
	5,26	LD3418	FCGR1A	Fc fragmento de IgG, receptor de alta afinidad Ia (CD64); Fc-gamma receptor I B2
	5,24	BG230586	SLC7A6	familia portadora de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, y + sistema), miembro 6
	5,18	AF015524	CORL2	quimicina (motivo C-C) tipo receptor 2
	5,13	AA831143	SLC45A3	familia portadora de solutos 45, miembro 3
	5,10	AJ240285	TRAT1	Adaptador transmembrana asociado a receptor de células T 1
	5,06	AW182080	GPR92	Receptor 92 acoplado a proteínas G
20	5,03	NM_003120	HLA-DOS	complejo principal de incompatibilidad, clase II, OD beta antígeno linfocitario 98
	5,03	NM_015364	LY96	PDZ asociado a Gring 1 y motivo de tropina en espiral que contiene dominio soma, dominio de inmunoglobulina (Ig), transmembrana carboxílica (TN) y dominio citosómático corto, (semanarosa) 48
	4,90	NM_020399	GOPC	distrofia macular vitíiforme 2 (mejor enfermedad, bestrofina)
	4,86	AK026133	SEMA4B	marco de lectura abierto 48 del cromosoma 14
	4,88	BC041664	VM02	Proteína filamentosa de guanina RAG 4
	4,86	NM_182692	C14orf49	integrina alfa L (antígeno CD11A (p180))
	4,86	AA229524	RASGRP4	Ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2A
	4,86	BC038777	ITGAL	Domino VPS10 relacionado con Sortilin que contiene el receptor 2
	4,87	AFC14403	PPAP2A	Fc fragmento de IgG, receptor de alta afinidad Ia (CD64)
	4,66	AK037698	SORCS2	proteína activadora de 5-lipoxigenasa de araquidonato
25	4,63	X14355	FCGR1A	receptor 1 de intersección t2, beta 1
	4,55	NM_001829	ALOX5AF	receptor 1 de prostaglandina E (isotipo EP1), 42 kDa
	4,50	AU155963	C16orf1	Familia de dominio SPPH1, miembro 1
	4,44	AM075032	HERV-FRD	Proteína HERV-FRD ancestral Env poliproteína
	4,42	NM_020360	GPR107	Receptor 107 acoplado a proteínas G
	4,37	BC000039	FAM25B	familia con similitud de secuencia 25, miembro 8
	4,35	NM_153761	IL12RB1	receptor de interleucina 12, beta 1
	4,35	A1762344	PTGER1	receptor 1 de prostaglandina E (isotipo EP1), 42 kDa
	4,31	NM_006459	SPPH1	espectrina, alfa, esférico 1 (esférico 2)
	4,27	NM_089129	SPTA1	espectrina 1 (proteína integral formadora de canales, 28 kDa)
30	4,22	AL516391	AQPF1	subfamilia C de proteoacilohidrato gamma
	4,12	AK026188	PCDHQC3	Diferenciación endotelial, receptor G-proteínoacoplado del ácido
	4,10	AU146698	EDG2	lipoftálico, 2
	4,06	BE873887	SLC14A1	Familia portadora de solutos 14 (transportador de urea), miembro 1 (K000 grupo sanguíneo)
	4,02	BF129889	TSPAN42	terraspanina 2
	4,00	AW243272	KCNK3	Canal de potasio, subfamilia K, miembro 3
	3,98	TS8858	CHRS3	Miembro 3 de deshidrogenasa / reductasa (familia SDR)
	3,94	A1827649	VT11A	Transporte de vesículas a través de la interacción con t-SNARE homólogo 1A (levedura)
	3,86	AL134012	NRXN2	Neuroxina 2
	3,83	BG230814	CD47	Antígeno CD47 (antígeno relacionado con Rb, señal asociada a integrina transductor)
35	3,80	A1869717	MOC15623	proteína hipotética MOC15623
	3,80	AM055583	SIMP	Fuente de péptidos inmunodominantes asociados a MHC
	3,76	AF023686	ITGAV	
40	3,72	AF023686	ITGAV	
	3,68	AF023686	ITGAV	
45	3,61	AF023686	ITGAV	
	3,57	AF023686	ITGAV	
	3,53	AF023686	ITGAV	
	3,50	AF023686	ITGAV	
	3,46	AF023686	ITGAV	
	3,42	AF023686	ITGAV	
	3,38	AF023686	ITGAV	
	3,34	AF023686	ITGAV	
	3,30	AF023686	ITGAV	
	3,26	AF023686	ITGAV	
50	3,22	AF023686	ITGAV	
	3,18	AF023686	ITGAV	
	3,14	AF023686	ITGAV	
	3,10	AF023686	ITGAV	
	3,06	AF023686	ITGAV	
	3,02	AF023686	ITGAV	
	2,98	AF023686	ITGAV	
	2,94	AF023686	ITGAV	
	2,90	AF023686	ITGAV	
	2,86	AF023686	ITGAV	
55	2,82	AF023686	ITGAV	
	2,78	AF023686	ITGAV	
	2,74	AF023686	ITGAV	
	2,70	AF023686	ITGAV	
	2,66	AF023686	ITGAV	
	2,62	AF023686	ITGAV	
	2,58	AF023686	ITGAV	
	2,54	AF023686	ITGAV	
	2,50	AF023686	ITGAV	
	2,46	AF023686	ITGAV	
60	2,42	AF023686	ITGAV	
	2,38	AF023686	ITGAV	
65	2,34	AF023686	ITGAV	

(continuación)

	Cambio de sed	Genbank	Símbolo genético	Descripción
5	3.79	NM_022189	IL3RA	receptor de interleucina 3, alta (baja actividad)
	3.79	AA608820	NRXN2	neurexina 2
	3.79	NM_006206	IL2RG	receptor de interleucina 2, gamma (inmunodeficiencia combinada grave)
	3.72	BC092737	VAMP2	proteína de membrana asociada a vesícula 2 (sinaptobrevina 2)
	3.72	BC015884	SIO	Agonista de la muerte del dominio que interactúa SH3; Dominio interactivo SH3; agonista de la muerte
10	3.68	A1688418	PLXNA2	plexina A2
	3.68	BC003195	PTP4A3	proteína tirosina fosfatasa tipo IV A, miembro 3
	3.68	NM_001772	CD93	Antígeno CD93 (gp97)
	3.68	A1955119	VAMP2	proteína de membrana asociada a vesícula 2 (sinaptobrevina 2)
	3.65	BC007524	SPAG8	espermatozoido antígeno 8
15	3.64	A1344359	SLC25A35	portador de solutos familia 25, miembro 35
	3.64	BC003253	KLHL20	kelch 20 (Drosophila)
	3.58	BF381637	C20orf152	marco de lectura abierto 52 del cromosoma 20
	3.51	NM_002688	RAP2A;	RAP2A, miembro de la familia de oncogenes RAS; RAP2B, miembro de la familia de oncogenes RAS
	3.50	NM_007063	TBC1D8	Familia de dominio TBC1, miembro 8 (con GRAM)
20	3.45	AK027160	BCL2L11	BCL2 11 (facilitador de apoptosis)
	3.44	BF055268	EDG2	diferenciación endotelial, receptor acoplado a proteína G de ácido lisofásitico, 2
	3.43	NM_003608	GPR85	Receptor G5 acoplado a proteínas G
	3.41	A1675433	PLXNA3	plexina A3
	3.40	AV734184	DPP8	dipeptidilpeptidasa 8
25	3.38	BC001956	KIAA1361	Gen KIAA1361
	3.34	NM_013332	HIG2	proteína inducible por hipoxia 2
	3.31	BC029450	SLC39A1	Familia de transportistas de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1
	3.28	BF077296	KIAA1361	Gen KIAA1361
	3.27	A1423691	CACNA2D4	canal de calcio, dependiente de voltaje, subunidad alfa 2/delta 4
30	3.26	AB014573	NPHF4	nefronofis 4
	3.25	AL582804	LY9	antígeno linfocitario 9
	3.25	BC0286280	CD86	Antígeno CD86 (antígeno CD28 ligando 2, antígeno B7-2)
	3.24	AA639289	SLC26A7	Portador de solutos familia 26, miembro 7
	3.24	NM_006211	CSP1R	receptor del factor 1 estimulante de colonias, anteriormente sarcoma telom
35				homólogo de oncogén viral (v-fms); factor estimulante de colonias 1
				receptor, anteriormente sarcoma telom viral de McDonough viral (v-fms); homólogo oncogénico
	3.19	A1051254	TRPM2	canal de catión potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 2
	3.19	AW392816	ABM02	dominio de abhidiplasa que contiene 2
	3.19	BC040275	RASGRIP1	Factor de liberación de nucleotídos de guanina específica de proteína Ras 1
40	3.19	NM_021911	GABPR92	receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA) A, 2
	3.19	A1660619	SLC7A6	familia portadora de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, y + sistémico), miembro 6
	3.18	NM_001680	SLC31A2	familia de transportistas de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 2
	3.18	NM_015680	C3orf24	marco de lectura abierto 24 del cromosoma 2
	3.17	AW068800	SLC36A1	familia de portadores de solutos 36 (importador de protones/aminoácidos), miembro 1
45	3.16	AL143049	HIP1	Huntington que interactúa con la proteína 1
	3.15	NM_026770	SENP2	pequeño factor 2 rico en SGPK
	3.15	NM_003568	EEA1	Antígeno endosómico precoz 1, 162 kD
	3.14	NM_020641	SLC2A9	portador de solutos familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 9
	3.14	WS0713	SLC24A4	familia portadora de solutos 24 (azúcar / potasio/calcio intercambiador), miembro 4
50	3.13	A1423186	TICAM2	molécula adaptadora del receptor tipo toll 2
	3.12	A1674647	SPP1L24	peptido señal similar a peptidasa 2A
	3.11	NM_0014121	GGTLA1	Actividad similar a la gamma-glutamiltransferasa 1
	3.10	NM_004546	NDUFB2	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 2, 88Da
	3.08	X15786	RET	ret protooncogén (neoplasia endocrina múltiple y carcinoma medular de tiroides 1, enfermedad de Hirschsprung)
55	3.08	AF131659	MRZL1	proteína de mielina cero 1
	3.08	A1571936	STAM3	molécula adaptadora de transducción de señal (dominio SH3 e ITAM motivo) 2
	2.99	NM_000201	ICAM1	molécula del adhesión intercelular 1 (CD54), receptor neutrófilo humano
	2.98	NM_025244	TSGA10	testículo específico, 10
	2.93	AU147338	PRKCE	Proteína quinasa C, epsilon
60	2.92	NM_024678	OGFR1	lectin de crecimiento opílica tipo receptor 1
	2.91	A2346036	ABCC4	Casa de unión a ATP, subfamilia C (OFR / MRP), miembro 4
	2.88	AA503877	CEPT1	Colina/etanolamina fosfolipotransferasa 1
	2.84	BC038893	PLJ21127	Proteína hipotíctica PLJ21127
	2.82	NM_001859	SLC31A1	familia de transportistas de solutos 31 (transportadores de cobre), miembro 1
65	2.81	M74721	CD78A	Antígeno CD78A (alta asociado a inmunoglobulina)
	2.79	A1986112	MGAT4B	Manosilico (alfa-1,3-)-glicoproteína beta-1,4-nacetylglucosaminiltransferasa, isoenzima B
	2.79	NM_030930	UND33B1	unc-93 homólogo B1 (<i>C. elegans</i>); unc-93 homólogo B1 (<i>C. elegans</i>)
	2.79	X74039	PLAUR	activador de plasmíndigena, receptor de uroquinas

(continuación)

	Cambio de fase	Genebank	Símbolo genético	Descripción
5	2,76	BC008263	KLHL20	leish 20 (Drosophila)
	2,73	AB036432	AGER	receptor de glicosilación avanzada específico del producto final
	2,71	NM_007245	ATXN2L	ataxina 2
	2,71	NM_016072	GOLT1B	GoGi transporte 1 homólogo B (S. cerevisiae)
	2,71	AM53548	ZDHHC8	dado de zinc, tipo DHHC que contiene 8
	2,70	AK036203	TMEM8	proteína 8 transmembrana (pirón dinámico que abarca la membrana)
	2,69	BE502509	T33AM	TRAF3 que interactúa con la proteína 3
10	2,68	AW117765	PEX13	factor de biogénesis peroxisoma 13
	2,68	AW052216	IL17RB	Receptor de interleucina 17 B
	2,67	NM_003853	S18RAP	proteína accesoria del receptor de interleucina 18
	2,66	NM_003490	NDUFA8	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 8, 14kDa
	2,65	NM_016639	TNFRSF12A	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 12A
	2,65	AI036318S	FLJ20255	Proteína hipotética FLJ20255
	2,65	NM_052991	SLAMP8	Miembro de la familia SLAM 8
15	2,65	AW571865	TNFRSF18L	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro tipo 18
	2,64	AA055414S	CERCAM1	molécula de adhesión celular endotelial cerebral 1
	2,63	AW510763	TMEM63A	proteína transmembrana 63A
	2,61	W95207	ACSL4	Acil-CoA sintetasa miembro de la familia de cadena larga 4
	2,60	S76475	NTPN3	tirosina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3
	2,60	AI130713	SIGLEC7	lectina 7 similar a la que se une al ácido sálico
	2,58	NM_003775	EDG8	diferenciación endotelial, receptor 8 acoplado a proteína G
20	2,58	AI078366	MAMDC4	Domínio MAM que contiene 4
	2,54	AF010447	MR1	complejo principal de histocompatibilidad, relacionado con la clase I
	2,54	NM_006068	TLR6	receptor 6 tipo toll
	2,53	AF041811	NTRK3	tirosina quinasa neurotrófica, receptor, tipo 3
	2,53	NM_053561	SERF2 :	pequeño factor 2 rico en EDPM, Huntington interactuando con la proteína K
	2,51	AW203275	CD53	Antígeno CD53
	2,49	AK022058	PLXNA2	Plaxina A2
25	2,49	AI125204	C8orf129	marco de lectura abierto del cromosoma 8 129
	2,49	NM_000382	ABCC2	Genete de unión a ATP, subfamilia C (CFTR / MRP), miembro 2
	2,48	BC032474	TIRAP	toll-interleukin 1 receptor proteína que contiene un adaptador que contiene el dominio
	2,44	NM_031211	INAA;	Pseudogen SLC7A5; Pseudogen SLC7A5; NPIP locus Locus tipo NPIP; proteína hipotética LOC440345;
		LOC388221;	proteína hipotética LOC440345; PI-3-quinasa relacionada con la quinasa	
		LOC440346;	Pseudogen SMG-1; PI-3-quinasa relacionada con la quinasa SMG-1	
		LOC440344;	Pseudogene; Pseudogen de la quinasa relacionada con PI-3-quinasa SMG-1; Quinasa	
30		LOC595191;	relacionada con PI-3-quinasa SMG-1 - como locus: PI-3-quinasa relacionada	
		LOC641298	con la quinasa SMG-1 locus	
	2,44	AI797836	CDS	SMG-1 locus
	2,41	W72082	C1QR1	Antígeno CD6 (p56-62)
	2,40	AA708616	DPPS	componente 1 del complemento, subcomponente q, receptor 1;
	2,40	BM887094	DLGAP4	Complemento componente 1, subcomponente q, receptor 1
	2,40	AL713719	LOC283301	díapéptidolipopéptida 9
35	2,39	AI638734	PRSLR	discos, proteína 4 grande (Drosophila) asociada al homólogo
	2,39	NM_012110	CHIC2	ATPasa, clase VI, tipo 11A
	2,38	AK022062	TFR2	receptor de prolactina
	2,37	NM_061565	I3BP1	dominio hidrofóbico rico en cisteína 2
	2,36	AA426091	C19orf115	receptor de transferrina 2
	2,36	BE347542	GOPC	superfamilia de immunoglobulinas, miembro 1
	2,36	NM_004231	ATP6V1F	marco de lectura abierto del cromosoma 19 15
40	2,36	AI130712	SIGLEC7	PDZ asociado a GoGi y motivo de bobina en espiral que contiene
	2,36	NM_017905	TMCD3	ATPasa, transporte H +, lisozima 14kDa, subunidad V1 F
	2,36	AB055885	CACNB1	lectina 7 similar a Ig que se une al ácido sálico
	2,36	NM_006003	NDUFA8	dominio transmembrana y en espiral 3
	2,35	NM_001251	CD88	canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad beta 1
	2,35	AA700888	PSO03	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1, subcomplejo alfa/beta, 1.8kDa
	2,35	U94963	CD44	Antígeno CD68
45	2,35	NM_003841	TNFRSF10C	Homología de Pleckstrin, Sec7 y dominio en espiral 2 (calmodulina-2)
	2,34	NM_004541	NDUFA1	Antígeno CD44 (función de búsqueda y sistema de grupos sanguíneos indios)
	2,33	BE587130	KLRK1	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10C, señaló sin un dominio intracelular
	2,33	NM_017469	CYP3A4	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 1, 7.5kDa
	2,31	AI038536	DSC3	Sustamila K del receptor tipo lectina de células asesinas, miembro 1
	2,31		citoesina P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4	
			Desmocélina 1	
50	2,30			
	2,29			
55	2,29			
	2,29			
	2,28			
	2,28			
	2,27			
	2,27			
	2,27			
60	2,26			
	2,26			
65	2,25			
	2,25			

ES 2 988 620 T3

(continuación)

	Cambio de Idi	Genbank	Símbolo genético	Descripción
5	2,31	NM_001783	CD79A	Antígeno CD79A (sita asociado a inmunoglobulina); CD79A antigeno (sita asociado a inmunoglobulina)
	2,30	AA333181	YTH1A	Transporte de vesículas a través de la interacción con t-SNARE homólogo 1A (fusión)
	2,30	AW134823	CD6	Antígeno CD6; Antígeno CD6
	2,30	AL137607	ATP882	ATPase, Clase I tipo 8B, miembro 2
10	2,29	A1671983	SLC2A9	portador de solutos familia 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 9
	2,29	AA018187	CD200G	cromosoma 22 marco de lectura abierto 3
	2,29	AL117415	ADAM33	ADAM dominio metalopeptidasa 33
	2,29	NM_082586	PCDHG3C3; PCDHGB4; PCDHGA8; PCDHGA12; PCDHGB8; PCDHGC4; PCDHGB7; PCDHGB5; PCDHGB6; PCDHGA9; PCDHGA7; PCDHGA8; PCDHGA5; PCDHGA4; PCDHGA3; PCDHGA2; PCDHGA1	subfamilia de protocadherina gamma C, 3; protocadherina gamma subfamilia B, 4; subfamilia de protocadherina gamma A, 8; subfamilia A de protocadherina gamma, 12; protocadherina gamma subfamilia C, 5; subfamilia de protocadherina gamma C, 4; subfamilia B de protocadherina gamma, 7; protocadherina gamma subfamilia B, 8; subfamilia B de protocadherina gamma, 6; subfamilia B de protocadherina gamma, 9; protocadherina gamma subfamilia B, 5; subfamilia B de protocadherina gamma, 1; subfamilia de protocadherina gamma A, 11; protocadherina gamma subfamilia A, 10; subfamilia de protocadherina gamma A, 5; subfamilia de protocadherina gamma A, 7; protocadherina gamma subfamilia A, 6; subfamilia de protocadherina gamma A, 5; subfamilia de protocadherina gamma A, 4; protocadherina gamma subfamilia A, 3; subfamilia A de protocadherina gamma, 2; subfamilia A de protocadherina gamma, 1
15				
20				
25				
30	2,29	NM_020880	GPR107	Receptor 107 acoplado a proteínas G
	2,29	AK074635	GENX-3414	Gensethonin 1
	2,29	BE138675	ITGB5	Integrina, beta 5
	2,29	NM_003830	SIGLEC5	lectina 5 de tipo Ig que se une al ácido sálico; lectina similar a Ig que se une al ácido sálico 5
35	2,28	NM_013318	USP10D1	UbiA dominio preniltransferasa que contiene 1
	2,28	M83889	PGPR1	receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (frosina quinasa relacionada con fos 2, síndrome de Pfeiffer)
	2,27	H67156	MSDP	Portador de solutos familia 25, miembro 37
	2,27	BC006215	SMEK2	Proteína KIAA1387; Proteína KIAA1387
	2,27	AL109633	SLTRK2	Familia tipo SLT y NTRK, miembro 2
	2,27	NM_007011	ABHD2	dominio de asidrolasa que contiene 2
	2,28	AT867210	MGC11332	Proteína hipotética MGC11332
40	2,28	BF722805	NRICAM	Molécula de adhesión celular neuronal
	2,28	PNB129	CDA08	Proteína inmunomoduladora de células T
	2,26	AF052059	SEL1L	sal-1 supresor de lin-12 (C. elegans)
	2,28	NM_005729	PPYF	peptidilproli isomerasa F (ciclofínsa F)
	2,25	BE858032	ARL2L1	Factor de ribosilación de ADP 2 1
	2,25	AK080293	C14orf116	Marco de lectura abierto del cromosoma 14 118
45	2,24	NM_017767	SLC39A4	portador de solutos familia 38 (transportador de zinc), miembro
	2,24	AL110273	SPTAN1	Espectrina alfa, no eritrocita 1 (alfa-fodrinas)
	2,24	AK077960	CDA08	Proteína inmunomoduladora de células T
	2,23	AA498867	SLC7A11	familia portadora de solutos 7, (transportador de aminoácidos catiónicos, y + sistema); miembro 11
50	2,23	NM_000634	IL8RA	receptor de interleucina 8, alfa
	2,22	AL330177	MGC34038	Familia portadora de solutos 44, miembro 6
	2,21	NM_001531	NPF1	complejo principal de histocompatibilidad, relacionado con la clase I
	2,21	NM_003183	ADAM17	ADAM metalopeptidasa dominio 17 (factor de necrosis tumoral, alfa, enzima convertidora)
	2,20	AC003999	SCAP92	sec fosforesteina 2 asociada a la familia
	2,20	BC014415	SLC33A1	familia portadora de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1
	2,20	AF226731	ADORA3	receptor de adenosina A3
55	2,19	AB008725	ICAM1	molécula de adhesión intercelular 1 (CD54), receptor de rinovirus humano
	2,19	U41163	SLOC6A8; PLXN3655	portador de solutos familia 8 (transportador de neurotransmisores, creatina), miembro 8; transportador similar a la creatina dependiente de sodio y cloruro
	2,18	AU147793	LRPC15	repetición rica en leucina que contiene 15
	2,18	AW337166	LOC255104	Dominios transmembrana y de botina en espiral 4
	2,18	NM_008505	PVR	receptor de poliovirus

(continuación)

	Caracter ísticas de fodd	Genbank	Síntesis genética	Descripción
5	2.18	AI638430	CLIC4	canal intracelular de cloro 4
	2.18	AI167482	SCUBE9	Péptido señal, dominio CUB, similar a EGF 3
	2.18	AI729514	HAG3	hialuronano sintasa 3
	2.18	NM_035971	FXYD3	Dominio FXYD que contiene el anclaje de transporte de iones 3
	2.17	AL022393	TRAP3IP3	TRAP3 que interactúa con la proteína 3
	2.17	U90840	FCGR2D	Fc fragmento de IgG, baja afinidad Ig, receptor para (CD32)
10	2.16	BC023540	SCORP1	VPS10 relacionado con Scortin que contiene el receptor 1
	2.16	AV713813	CSTM1	proteína transmembrana asociada a vesicopermeo 1
	2.15	NM_024805	NOX5	NADPH oxidasa dominio de unión a calcio EF-mano 5
	2.15	BC006178	SEC22L3	Vesículas SEC22 que trafican con proteínas 3 (S. cerevisiae); SEC22 tráfico de vesículas similar a la proteína 3 (S. cerevisiae)
15	2.15	BG151527	GRIKS	receptor de glutamato, ionotrópico, kainato 5
	2.14	AW001754	NEGR1	regulador de crecimiento neuronal 1
	2.14	NM_013979	BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19KDa que interactúa con la proteína 1
	2.14	NM_018643	TREM1	receptor esencialmente expresado en células mieloides 1
	2.12	NM_005264	GPR98	Receptor G acoplado a proteínas G
	2.11	AA454190	ZONHC2B	dedo de zinc, tipo ZONHC que contiene 20
20	2.11	AB048796	TMPPRSS13	proteína transmembrana, sena 13
	2.11	AL044520	NYD-SP21	NYD-SP21 relacionado con el desarrollo de los testículos
	2.11	BE492930	TMAP1	Remodelación matricial asociada 7
	2.10	NM_152264	SLC39A13	portador de solutos familia 39 (transportador de zinc), miembro 13
	2.06	AL530874	EPHB2	Receptor de EPH B2
	2.07	NM_016638	VPS33B	proteína vascular que clasifica 33B (levadura)
25	2.07	NM_024531	GPR172A	Receptor 172A acoplado a proteínas G
	2.07	NM_033038	ADAM18	dominio de ADAM metalo-opeptidasa 18 (metrín beta)
	2.07	BC001281	TNFRSF1QB	supertamila de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10b
	2.07	AF217749	PGCH89	protoadherina beta 9
	2.06	AB036077	PGPR2	receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (quinasa expresada en bacterias, receptor del factor de crecimiento de queratinocitos, disostosis craneofacial 1, Síndrome de Crozon, síndrome de Pleitier, Jackson-Weiss síndrome)
30	2.06	AL137442	SUSD1	dominio de sushi que contiene 1
	2.06	NM_004518	KCNQ3	canal dependiente de voltaje de potasio, subunidad similar a KCQT, miembro 3
	2.04	AI672363	VPS33B	proteína vascular que clasifica 33B (levadura)
	2.04	NM_006671	SLC1A7	portador de solutos familia 1 (transportador de glutamato), miembro 7
	2.03	AA215519	OLGAP1	Oicos, proteína grande (Drosophila) asociada al homólogo 1
	2.03	NM_004648	PTPNS1	proteína tirosina fosfatasa, anverso de tipo receptor 1
35	2.02	NM_002554	P2RY2	receptor purinérico P2Y, acoplado a proteínas G, 2
	2.01	BF511678	SCUBE3	Péptido señal, dominio CUB, similar a EGF 3
	2.01	BC013985	CLEC7A	Familia de dominio de lectina de tipo C 7, miembro A

40 [0136] **CD47 facilita el injerto, inhibe la fagocitosis y se expresa en mayor medida en las LSC de AML.** Desde hace tiempo se reconoce que el sistema inmunitario innato, a través de las células efectoras natural killer (NK), actúa en la eliminación de células no propias y aberrantes. Las células NK eliminan células diana reconocidas por una variedad de receptores activadores de células NK que se unen a ligandos presentes en muchas células normales; sin embargo, la expresión de moléculas propias del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I puede proteger a una célula al unirse a receptores inhibidores de NK.

45 [0137] Estos receptores inhibidores a menudo contienen motivos inhibidores basados en tirosina inmunorreceptora (ITIM) que reclutan y activan las tirosina fosfatases SHP-1 y SHP-2, que a su vez inhiben la transducción de señales de los receptores activadores. Cada vez hay más pruebas de que las células efectoras derivadas de monocitos, como los macrófagos y las células dendríticas, también participan en la eliminación de células no propias y aberrantes, mediada por una serie de receptores activadores. Estas células efectoras también expresan el receptor inhibidor, la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α), que contiene un motivo ITIM capaz de reclutar y activar las fosfatases SHP-1 y SHP-2, lo que provoca la inhibición de la fagocitosis. Varios estudios han identificado CD47 como el ligando de SIRP α . CD47 es una proteína transmembrana ampliamente expresada, identificada originalmente como proteína asociada a integrinas (IAP) debido a su asociación física con varias integrinas.

55 [0138] CD47 se ha implicado en una serie de procesos que incluyen la activación plaquetaria, la motilidad y adhesión celular, y la adhesión, migración y fagocitosis leucocitaria. La interacción CD47-SIRP α ha sido implicada en la inhibición de la fagocitosis a partir de una serie de estudios. En primer lugar, los macrófagos esplénicos eliminaron rápidamente del torrente sanguíneo los glóbulos rojos de ratón deficientes en CD47, pero no los de tipo salvaje, cuando se transfundieron a ratones de tipo salvaje, y este efecto dependía de la interacción CD47-SIRP α . Los linfocitos y células de médula ósea deficientes en CD47, pero no los de tipo salvaje, también se eliminaron rápidamente tras el trasplante a receptores congénitos de tipo salvaje mediante fagocitosis mediada por macrófagos y células dendríticas. Otras pruebas sugieren que la interacción CD47-SIRP α puede inhibir la fagocitosis estimulada por el reconocimiento de IgG o de células opsonizadas por el complemento. Así pues, CD47 funciona como un regulador crítico de la fagocitosis de macrófagos y células dendríticas al unirse a SIRP α y emitir una señal inhibidora dominante.

65 [0139] Determinamos la expresión de CD47 en LSC de AML humana y HSC normal por citometría de flujo. Se analizó la

expresión superficial de CD47 en las HSC (Lin-CD34+CD38-CD90+) de tres muestras de sangre periférica movilizada humana normal y en las LSC de AML (Lin-CD34+CD38-CD90-) de siete muestras de AML humana (Figura 2). CD47 se expresaba en niveles bajos en la superficie de las HSC normales; sin embargo, su expresión media era aproximadamente 5 veces mayor en las LSC de AML, así como en los blastos leucémicos masivos.

5 **[0140]** El *Anticuerpo Monoclonal Anti-CD47 Humano Estimula la Fagocitosis e Inhibe el Injerto de LSC de AML*. Para probar el modelo de que la sobreexpresión de CD47 en las LSC de AML impide la fagocitosis de estas células a través de su interacción con SIRPa, en las células efectoras, hemos utilizado un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 conocido por interrumpir la interacción CD47-SIRPa. El hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal CD47 ratón-10 antihumano, denominado B6H12, se obtuvo de ATCC y se utilizó para producir anticuerpo purificado. En primer lugar, realizamos ensayos de fagocitosis *in vitro*. Las LSC primarias de AML humana se purificaron mediante FACS a partir de dos muestras de AML humana y, a continuación, se cargaron con el colorante fluorescente CFSE. Estas células se incubaron con macrófagos derivados de médula ósea de ratón y se controlaron mediante microscopía de inmunofluorescencia (Figura 2) y citometría de flujo (Figura 3) para identificar las células fagocitadas. En ambos casos, 15 no se observó fagocitosis en presencia de un anticuerpo de control del isótipo; sin embargo, se detectó una fagocitosis significativa con la adición del anticuerpo anti-CD47. Así, el bloqueo de CD47 humano con un anticuerpo monoclonal es capaz de estimular la fagocitosis de estas células por macrófagos de ratón.

20 25 **[0141]** A continuación investigamos la capacidad del anticuerpo anti-CD47 para inhibir el injerto de LSC de AML *in vivo*. Dos muestras primarias de AML humana se trajeron o recubrieron con el anticuerpo anti-CD47 antes del trasplante en ratones recién nacidos NOG. 13 semanas después, los ratones fueron sacrificados y se analizó el injerto de leucemia humana en médula ósea mediante citometría de flujo (Figura 5). Los ratones de control mostraron un injerto leucémico, mientras que los transplantados con las células recubiertas de anti-CD47 mostraron un injerto escaso o nulo. Estos datos indican que el bloqueo de CD47 humano con un anticuerpo monoclonal es capaz de inhibir el injerto de LSC de AML.

30 35 **[0142]** CD96 es una molécula de superficie celular específica de las células madre de la leucemia mieloide aguda humana. CD96, originalmente denominada Tactile, se identificó por primera vez como una molécula de superficie de las células T que se regula al alza en el momento de su activación. El CD96 se expresa en niveles bajos en las células T y NK en reposo y aumenta fuertemente en ambos tipos de células tras la estimulación. No se expresa en otras células hematopoyéticas, y el examen de su patrón de expresión demostró que, por lo demás, sólo está presente en algunos epitelios intestinales. El dominio citoplasmático de CD96 contiene un motivo ITIM putativo, pero se desconoce si funciona en la transducción de señales. CD96 promueve la adhesión de las células NK a las células diana que expresan CD155, lo que resulta en la estimulación de la citotoxicidad de las células NK activadas.

40 45 **[0143]** *Expresión Preferencial en Superficie Celular de Moléculas Identificadas a partir del Análisis de Expresión Génica*. Además de CD47 y CD96, se sabe que varias de las moléculas enumeradas en la Figura 2B se expresan en las LSC de AML, entre ellas: CD123, CD44, and CD33. Las moléculas restantes no se han descrito previamente ni se han identificado como expresadas preferentemente en las LSC humanas de AML en comparación con sus homólogas normales. Hemos examinado la expresión de la superficie celular de dos de estas moléculas mediante citometría de flujo para determinar si existe una expresión preferente en las LSC de AML en comparación con las HSC normales.

50 55 **[0144]** Para evaluar los otros genes candidatos de la Figura 1B, examinamos esta lista en busca de aquellas moléculas que no es probable que se expresen en las HSC normales basándose en los valores de expresión brutos de la matriz. A continuación, utilizando informes publicados, investigamos el patrón de expresión tisular de estos genes, con el fin de identificar aquellos con patrones de expresión muy restringidos para los que los anticuerpos monoclonales tendrían pocos objetivos además de las células leucémicas. Basándose en estos métodos, se identificaron dos genes prometedores: Receptor 2 de la hormona paratiroides y Receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (también conocido como TIM-3: inmunoglobulina de células T mucina 3). El receptor 2 de la hormona paratiroides (PTHR2) se expresa normalmente en el páncreas y en algunas zonas del sistema nervioso central. Su ligando principal es un péptido denominado péptido tuberoinfundibular 39 (TIP39). El Receptor Celular 2 del Virus de la Hepatitis A (HAVCR2) se expresa normalmente en un subconjunto de linfocitos T. Su ligando principal es una molécula denominada Galectina-9.

60 65 **[0145]** La validación de secuencias adicionales utiliza anticuerpos específicos y pruebas por citometría de flujo, con comparación con células progenitoras multipotentes normales.

Ejemplo 2

60 65 **[0146]** CD99 es una glicoproteína de superficie con la mayor expresión en células T donde puede funcionar en la adhesión celular. La expresión de CD99 en HSC (Lin-CD34+CD38-CD90+) de tres muestras de sangre de cordón umbilical humana normal y LSC de AML (Lin-CD34+CD38-CD90-) de siete muestras de AML humana se determinó mediante citometría de flujo (Figura 6). El CD99 se expresaba en niveles bajos en la superficie de las HSC normales; sin embargo, en promedio, se expresa aproximadamente 5 veces más en las CLL de la AML. El CD97 se expresa normalmente en la mayoría de las células hematopoyéticas maduras y se regula al alza en los linfocitos activados, donde puede desempeñar una función en la migración y adhesión celulares. Los perfiles de expresión génica indican una expresión de CD97 de baja a ausente en las HSC y las MPP, con una expresión aproximadamente 10 veces mayor en las LSC de AML. La expresión de CD97 en las HSC de sangre de cordón umbilical normal y en las LSC de AML se examinó mediante citometría de flujo y se

observó que estaba ausente en las HSC y era elevada en 5 de las 7 muestras de LSC de AML (Figura 7).

[0147] Examinamos la expresión superficial de CD97, CD99, CD180 y TIM3 (HAVCR2) en varias muestras de HSC (tanto de médula ósea normal como de sangre de cordón umbilical) y múltiples muestras de AML humana de novo, utilizando 5 citometría de flujo. Encontramos una expresión aumentada de cada una de estas moléculas en las LSC de AML con una expresión baja o ausente en las HSC (Figuras 8-10). También investigamos la expresión de PTH2R en HSC de médula ósea y LSC de AML mediante PCR cuantitativa en tiempo real, ya que no se dispone de ningún anticuerpo monoclonal validado para citometría de flujo para este antígeno. No encontramos expresión de PTHR2 en HSC con expresión aumentada en LSC de AML.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 10
- 5 1. Un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 que bloquea la interacción de CD47 con SIRPa, para su uso en el tratamiento de una afección preleucémica mediante la inhibición del injerto de células madre leucémicas (LSC) de AML, en el que el bloqueo de la interacción de CD47 con SIRPa estimula la fagocitosis de LSC de AML por macrófagos.
2. El anticuerpo monoclonal para uso de la reivindicación 1, en el que la afección preleucémica es un síndrome mielodisplásico (SMD) o un trastorno mieloproliferativo (TMP).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1(A)

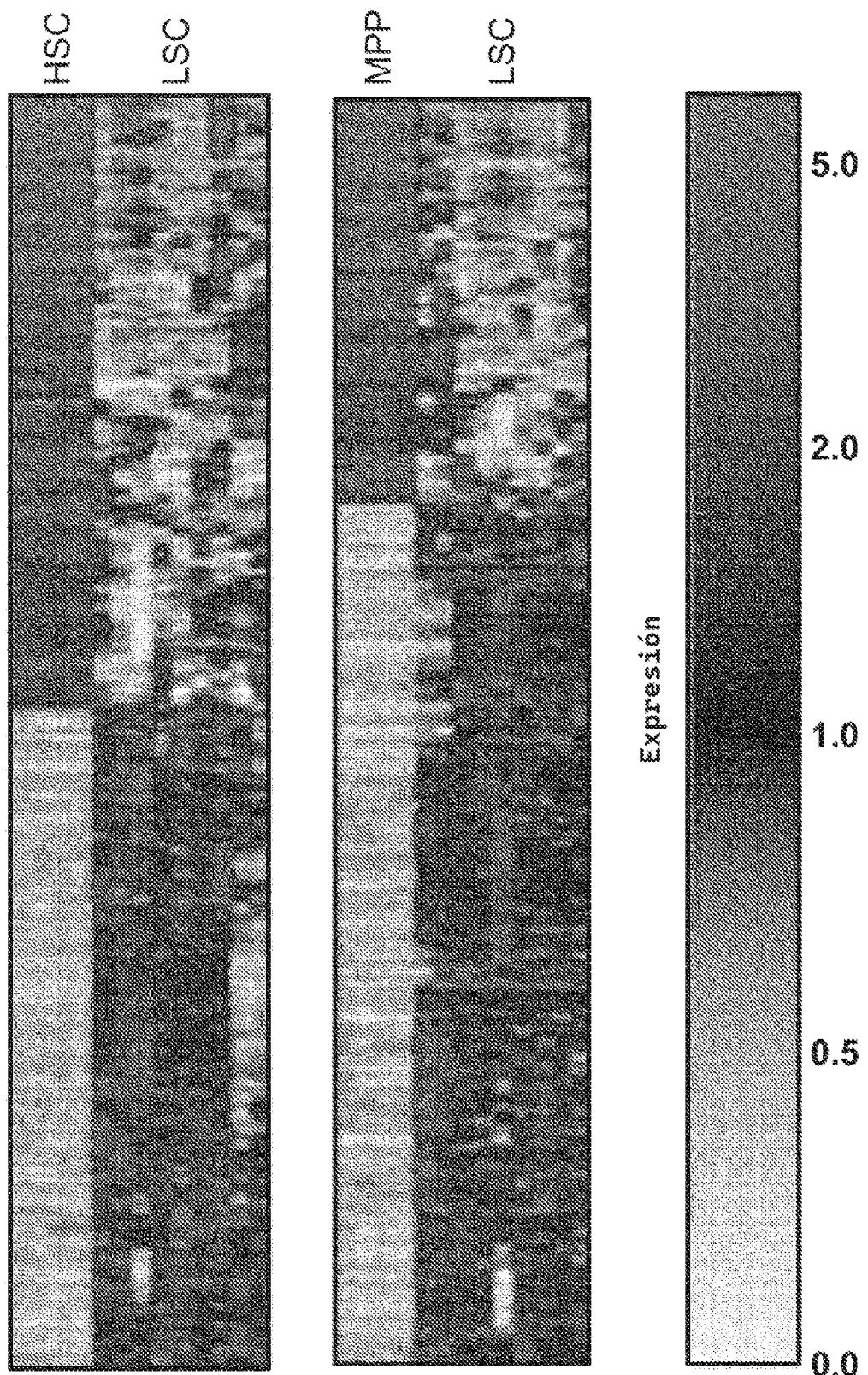


FIGURA 1(B)

Genebank	Simbolo génico	Gen	Cambio de fold HSC	Cambio de fold Mpp
NM_005816	CD96	antígeno CD96	57.5	66.7
NM_002182	IL1RAP	proteína necesaria del receptor de interleucina 1	31.0	31.0
NM_003322	TYROBP	proteína de unión de quinasa de tirosina de proteína (TAK1)	27.4	27.4
NM_034271	LY86	antígeno linfocítico 66	26.9	37.3
NM_0035048	PTHR2	receptor de hormonas neurotropicas 2	18.4	19.2
AK023747	ADR81	receptor de neuroglicina, beta-1	17.7	16.0
US2027	CD41	receptor 1 de componentes complementarios 3a	16.8	19.6
AF025572	HAVCR2	receptor celular 2 de virus de hepatitis A	14.5	16.1
AF285447	HCST	transductor de señal celular hematopoyética	12.5	11.4
AK003223	LGR7	GPR87 que contiene respuesta inco en leucina	11.9	9.8
NM_016092	NETO2	neuroglicina (NGN) y tirosína (T1112)	11.5	13.1
BF435675	CD69	antígeno CD69	10.8	6.9 NS
NM_001769	CD9	antígeno CD9	10.5	11.0 NS
NM_003582	CD160	antígeno CD160	9.6	10.9
AF038486	GPR34	receptor 34 acoplado a proteína G	7.5	10.5
AK023776	ITGA6	integrina, alfa 6	7.3	11.3
NM_005296	GPR23	receptor 23 acoplado a proteína G	6.6 NS	10.5
MA1685	ITGAX	integrina, alfa X	6.1 NS	6.1
NM_001784	CD97	antígeno CD97	5.6 NS	7.8 NS
BG220314	CD47	antígeno CD47	3.8	4.5
NM_001560	IL13RA1	receptor de interleucina 13, alfa 1	3.8 NS	7.9
NM_002183	IL3RA	antígeno CD123	3.8	3.4
NM_001772	CD33	antígeno CD33	3.7	4.8
BF513345	CD99	antígeno CD99	3.2	4.5
U94933	CD44	antígeno CD44	2.3	2.6

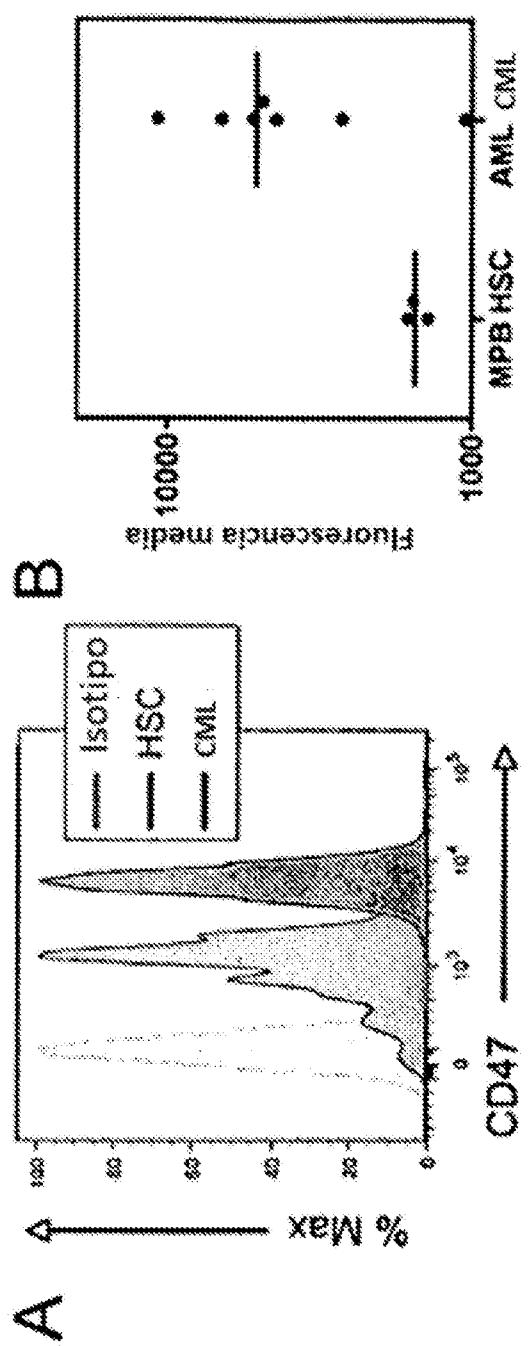


FIGURA 2

FIGURA 3

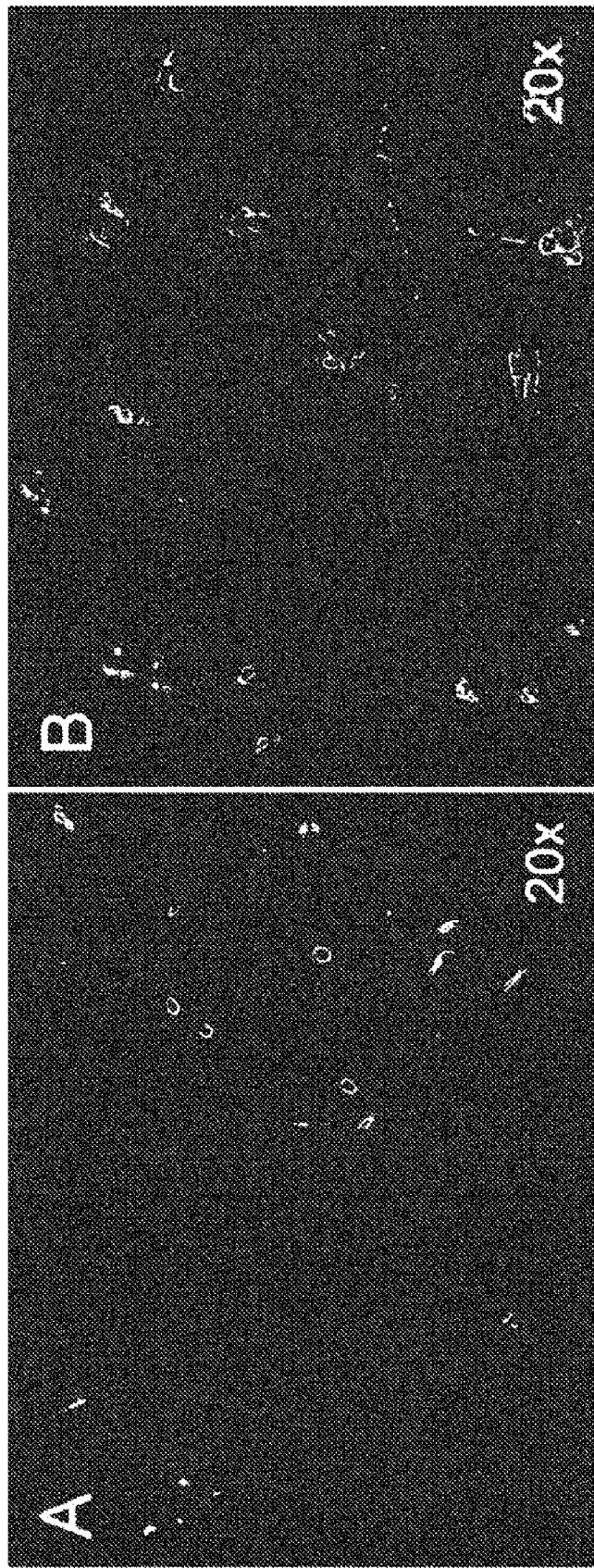
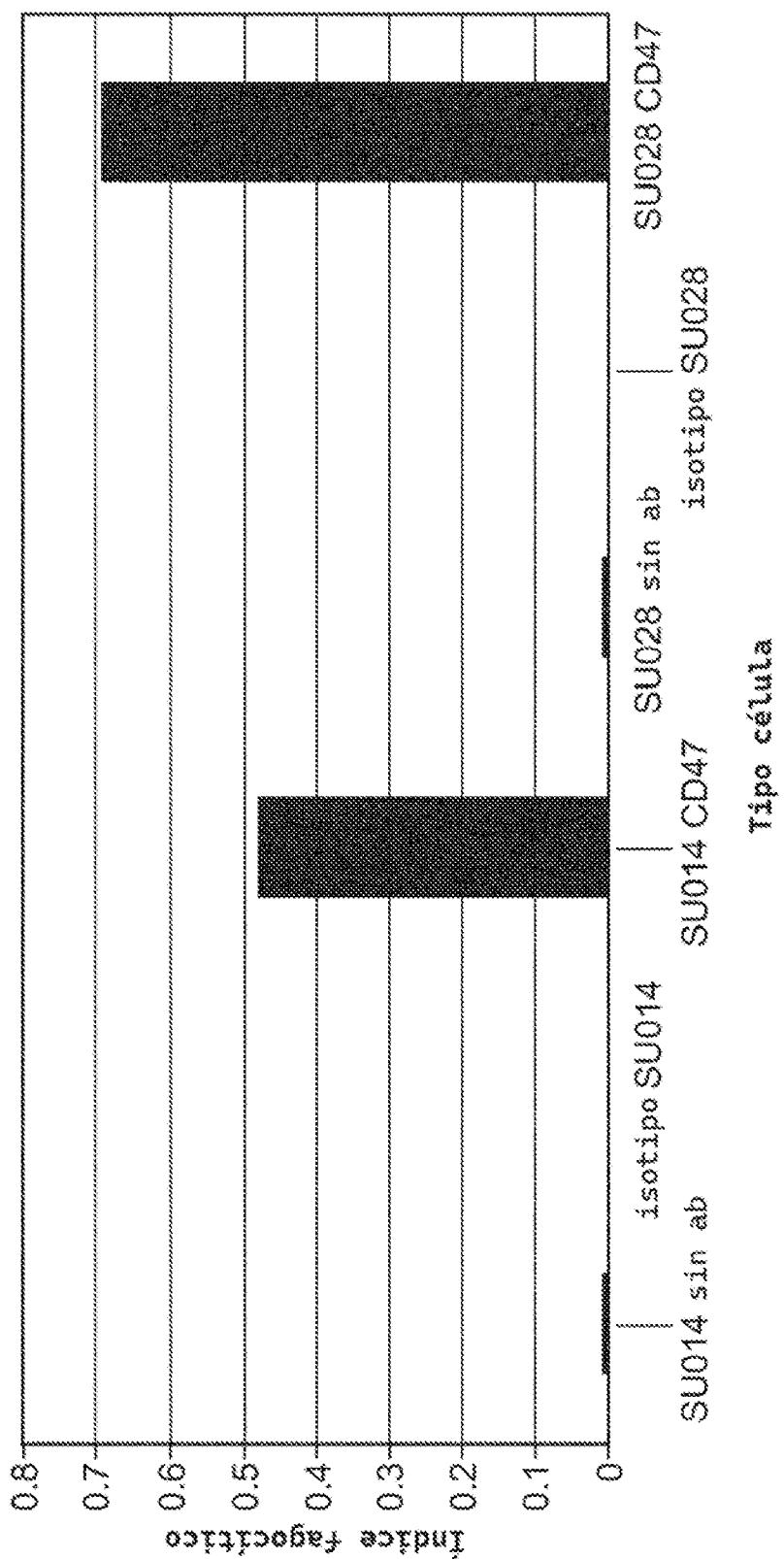


FIGURA 3(C)
Efecto de Anti-CD47 en LSC Humanas



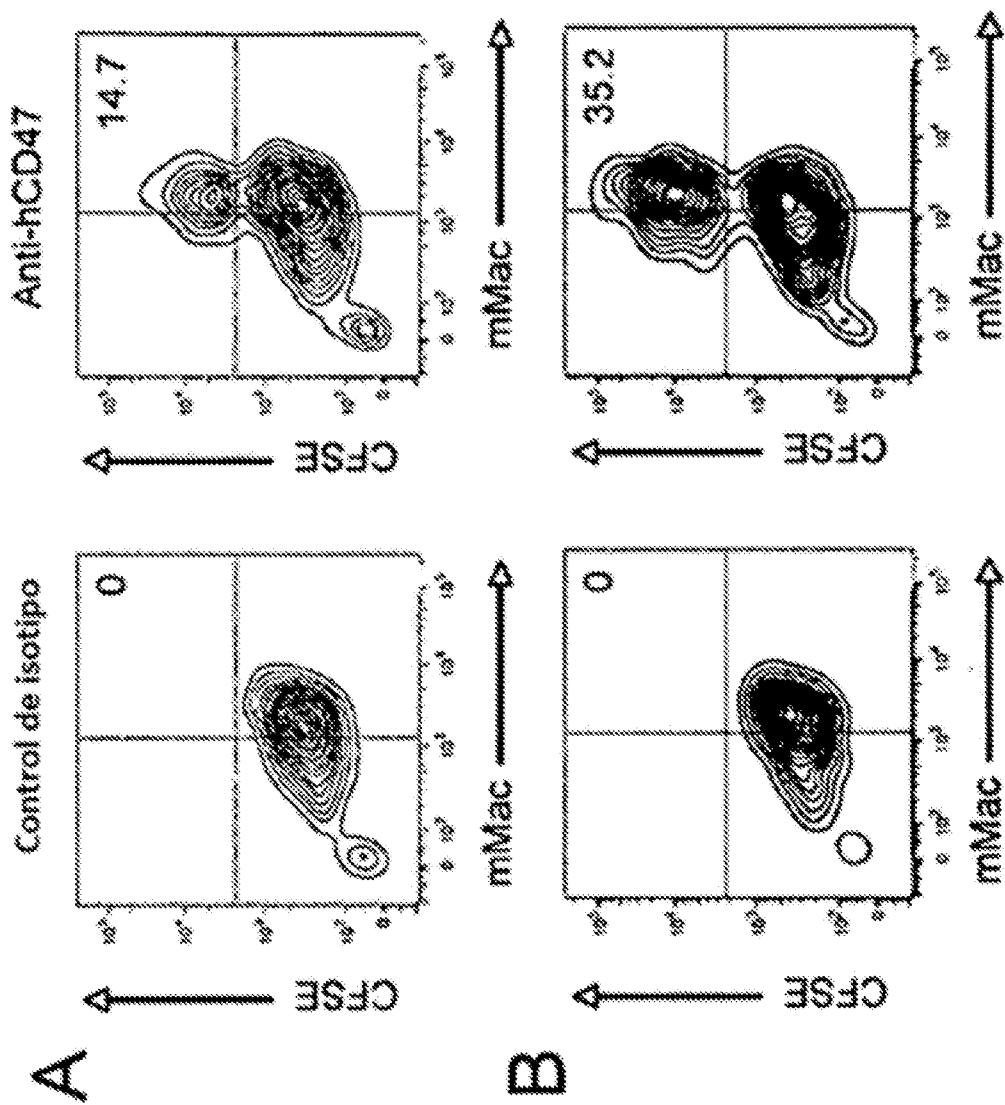


FIGURA 4

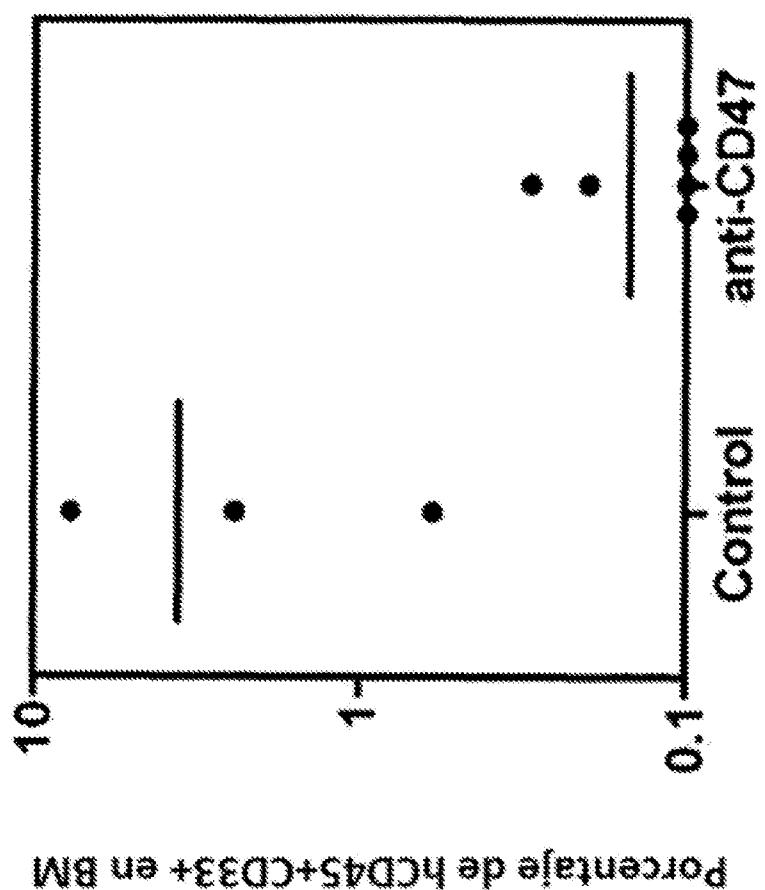
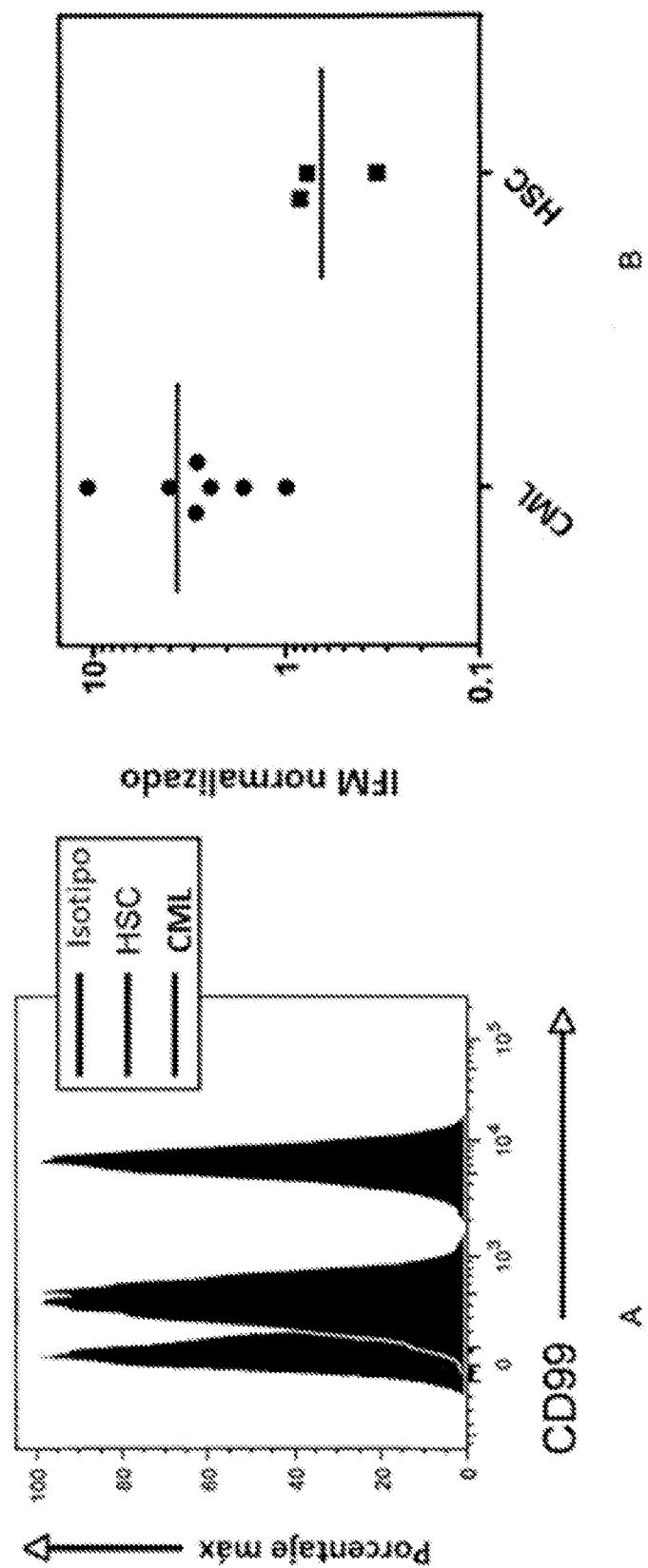


FIGURA 5

FIGURA 6



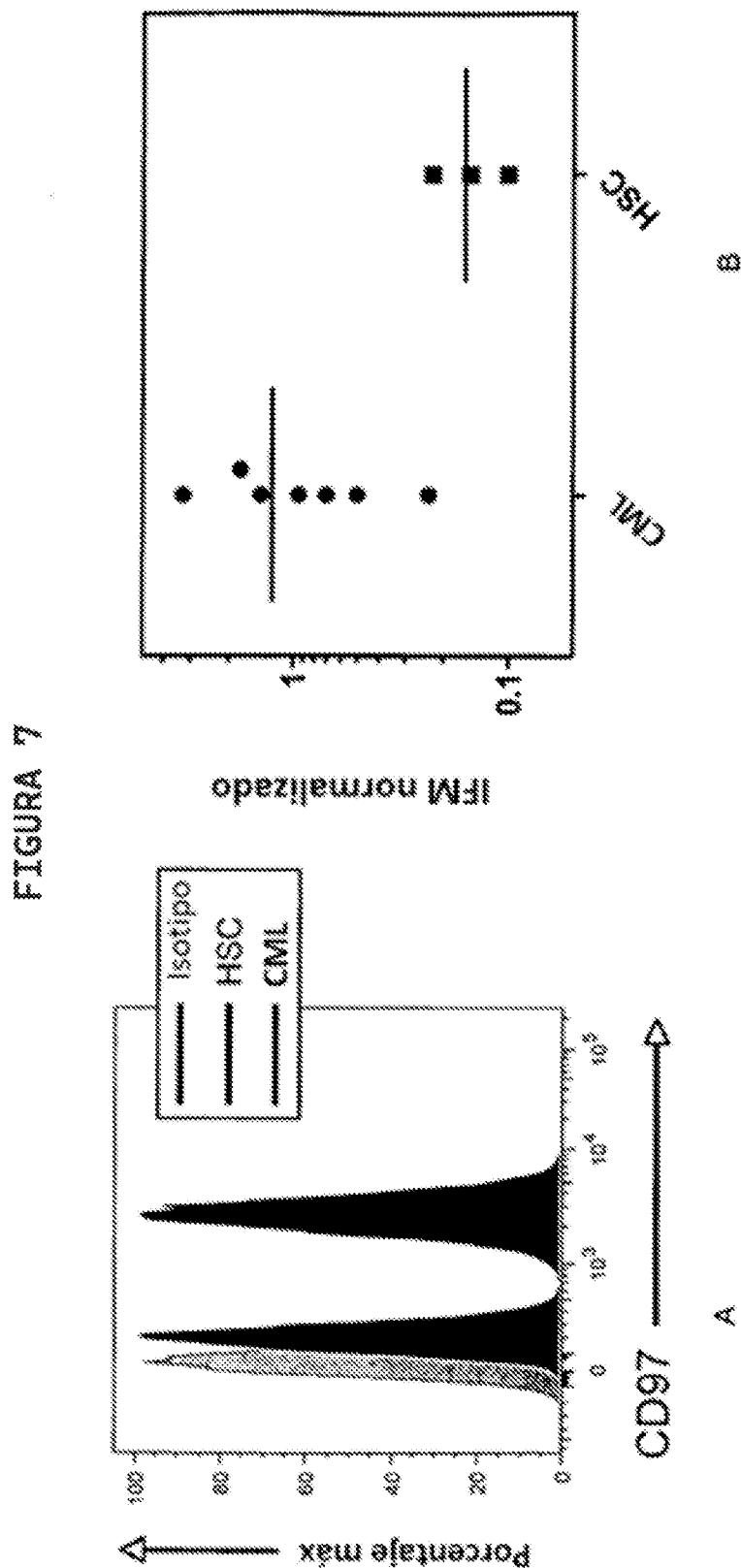


FIGURA 8

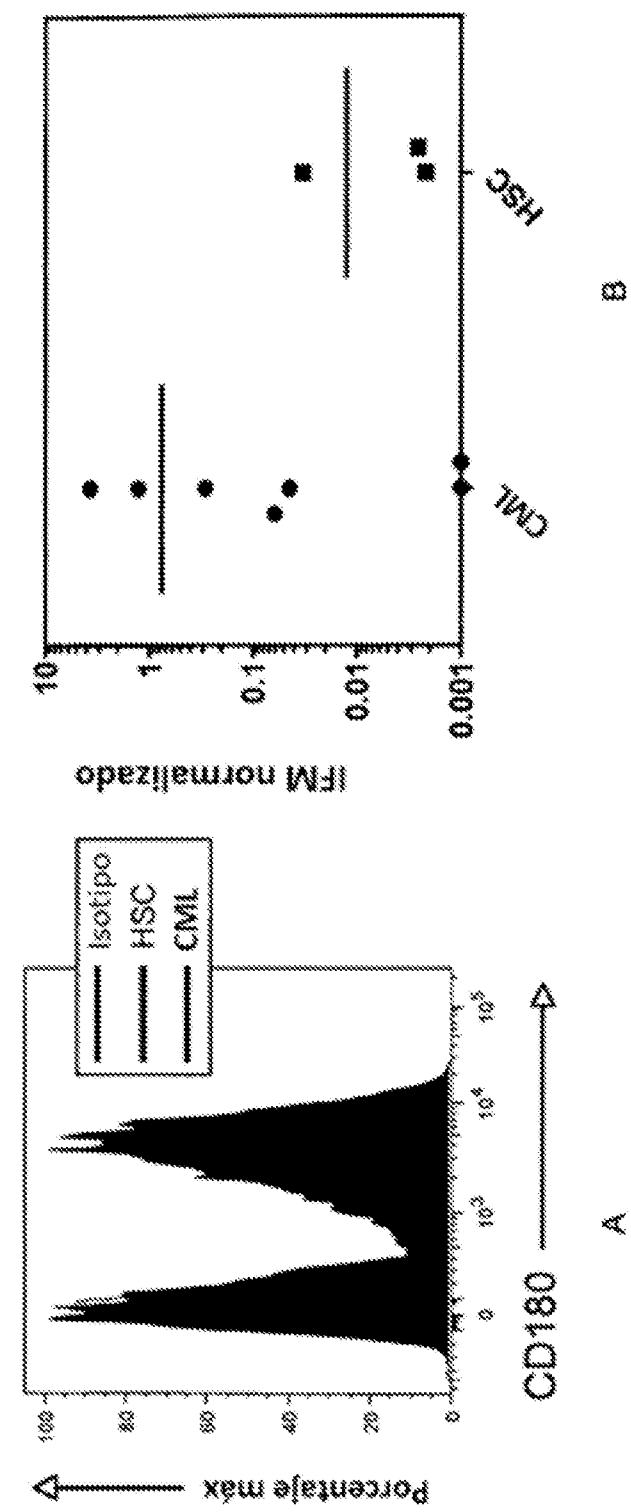


FIGURA 9

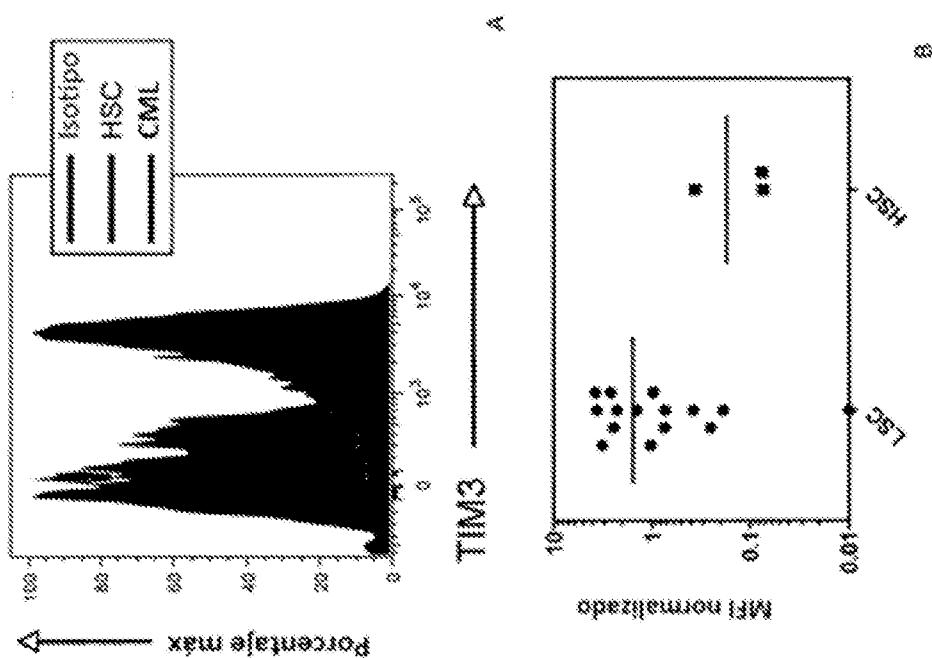


FIGURA 10

