

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 016**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2008 E 08742787 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2155248**

54 Título: **Direccionamiento de ABCB5 para terapia para el cáncer**

30 Prioridad:

12.04.2007 US 923128 P

11.12.2007 US 7059 P

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

30.09.2015

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)

75 FRANCIS STREET
BOSTON MA 02115, US

72 Inventor/es:

FRANK, MARKUS H.;
FRANK, NATASHA Y. y
SAYEGH, MOHAMED H.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 547 016 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

Direccionamiento de ABCB5 para terapia para el cáncer

5 **Antecedentes de la invención**

10 El melanoma maligno humano es un cáncer altamente resistente a la quimioterapia. En la actualidad no existen muchas opciones de tratamiento eficaces. El melanoma maligno de la piel es altamente predominante en Estados Unidos, con 1 de 63 hombres y mujeres que afectados durante su vida. De ellos, un 11 % se diagnostica después de que el cáncer se haya diseminado a los ganglios linfáticos regionales o directamente más allá del sitio primario y un 3 % después de que el cáncer ya ha hecho metástasis (estadio distante), con tasas de supervivencia relativa correspondientes a 5 años de un 63,8 % y un 16,0 %.

15 **Sumario de la invención**

20 La invención se basa al menos en parte en el descubrimiento de que las células madre tumorales quimiorresistentes ABCB5+ contribuyen al desarrollo de cánceres tales como melanoma y que estas células se pueden dirigir para el tratamiento del cáncer. El direccionamiento de ABCB5 se puede usar, ya sea como un enfoque terapéutico independiente para la enfermedad diseminada, o como un tratamiento adicional para sensibilizar las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos, especialmente en aquellos pacientes con enfermedad metastásica resistente en la actualidad. Una ventaja de los enfoques terapéuticos dirigidos por ABCB5 es que se dirigen a las células madre tumorigénicas, mientras que los agentes terapéuticos convencionales se dirigen solamente a la mayor parte de la población de células tumorales.

25 En algunos aspectos se describe un método para suministrar un agente terapéutico a un compartimento intracelular de una célula poniendo en contacto una célula con una molécula aislada que se une selectivamente a ABCB5 conjugadas con un agente terapéutico en una cantidad eficaz para suministrar el agente terapéutico a un compartimento intracelular de la célula.

30 En algunas realizaciones, la molécula aislada que se une selectivamente a ABCB5 es un péptido aislado. En otras realizaciones es una molécula pequeña. El péptido aislado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo o un scFv.

35 El agente terapéutico puede ser, en algunas realizaciones, una toxina, un ARNsi, un agente de quimioterapéutico o un anticuerpo terapéutico.

40 El método implica, en otras realizaciones, la etapa de poner en contacto una célula con una molécula aislada que se une de forma selectiva a un marcador de superficie tal como CD49e, CD133, CD166, BMPR1a, TIR-1, VE-cadherina (CD144) o nestina.

45 En otras divulgaciones se proporciona una composición de un péptido aislado que se une de forma selectiva a ABCB5 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8, o variantes funcionalmente equivalentes de la misma que contienen sustituciones conservativas, en el que el péptido aislado no es mAb 3C2-ID12.

50 En otras divulgaciones en el presente documento, se proporciona una composición de un péptido aislado que se une de forma selectiva a ABCB5 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, y SEC ID N°: 8, o variantes funcionalmente equivalentes de la misma que contienen sustituciones conservativas. El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo está presente en una cantidad eficaz para aumentar la quimiosensibilización en un sujeto humano.

55 De acuerdo con otra divulgación más en el presente documento, se proporciona una composición de un péptido aislado que se une de forma selectiva a ABCB5 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 and SEC ID N°: 8, o variantes funcionalmente equivalentes de la misma que contienen sustituciones conservativas. El péptido aislado se coformula con un agente terapéutico.

60 El péptido aislado, en algunas realizaciones, se conjuga con el agente terapéutico. En otras realizaciones, el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en camptotecina 9-NH₂, mitoxantrona, camptotecina 7-Cl, pirazofurina, menogarilo, éster de camptotecina 20, camptotecina, amsacrina, etopósido, derivado de antrapirazol, ternipósido, camptotecina 11-formilo, camptotecina 10-OH, daunorrubicina, doxidoxorrubicina, doxorubicina, oxantrazol, camptotecina 11-CASA, zorrubicina, mostaza de uracilo, piperazinadiona, hepsulfam, melfalán, bisantreno, trietilenmelamina, espiromustina, Yoshi-864, clorambucilo, mostaza de piperazina, hidroxurea, porfiromicina, mecloretamina, fluorodopán, mitomicina, citarabina (araC), dianhidrogalaactitol, gemcitabina, tiotepa,

N,N-dibencil-daunomicina, teroxirona, y glicinato de afidicolina.

5 Se proporciona un kit de acuerdo con otras divulgaciones en el presente documento. El kit incluye un recipiente que alberga un péptido aislado que se une de forma selectiva a ABCB5 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 12, o variantes funcionalmente equivalentes de la misma que contienen sustituciones conservativas, e instrucciones para la administración del péptido aislado a un sujeto humano.

10 Se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto de acuerdo con otras divulgaciones en el presente documento. El método implica la administración sistemática de un péptido aislado que se une de forma selectiva a ABCB5 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8, o variantes funcionalmente equivalentes de la misma que contienen sustituciones conservativas a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

15 También se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto mediante la administración de una cualquiera de las composiciones que se describen en el presente documento a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

20 Se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto de acuerdo con otras divulgaciones en el presente documento. El método implica la administración de un péptido aislado que se une de forma selectiva a ABCB5 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 and SEC ID N°: 8, o variantes funcionalmente equivalentes de la misma que contienen sustituciones conservativas y un agente quimioterapéutico, a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

25 De acuerdo con otras divulgaciones en el presente documento, se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto mediante la administración sistémica a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad eficaz para tratar el cáncer de un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une de forma selectiva a ABCB5 y un agente quimioterapéutico.

30 En el presente documento se desvela un péptido aislado de un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, en el que: (i) CDR1-H1 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3; (ii) CDR2-H2 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; y (iii) una secuencia de CDR3-H3, en las que el péptido aislado no es mAb 3C2-1D12. En algunas realizaciones, el CDR3-H3 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3. El péptido aislado se puede unir a ABCB5 humana y puede ser un anticuerpo. Opcionalmente, el péptido aislado incluye adicionalmente un dominio variable de cadena ligera en el que CDR1-L1 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6, un CDR2-L2 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7 y/o un CDR3-L3 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8.

35 También se describe un péptido aislado que tiene un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en el que: (i) CDR1-L1 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6; (ii) CDR2-L2 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7; y (iii) una secuencia de CDR3-L3, en la que el péptido aislado no es mAb 3C2-1D12. En algunas realizaciones, el CDR3-L3 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8.

40 Se proporciona un péptido aislado que tiene al menos dos dominios variables de anticuerpo: (a) un dominio variable de anticuerpo de cadena pesada que comprende el péptido aislado tal como se describe en el presente documento y (b) un dominio variable de anticuerpo de cadena ligera que comprende el péptido aislado tal como se describe en el presente documento de acuerdo con otras divulgaciones en el presente documento. En algunas realizaciones, el péptido aislado es un Fv de cadena sencilla. En otras realizaciones el péptido aislado es un péptido aislado de Fab. Además como en otras realizaciones el péptido aislado es un péptido aislado totalmente humano.

45 El péptido aislado puede incluir adicionalmente regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3, y/o FR4 para un dominio variable de péptido aislado que corresponde a la variante CDR1-H1, CDR2-H2, CDR3-H3, en el que las regiones marco conservadas se obtienen a partir de un solo molde de polipéptido. Cada una de las regiones marco conservadas puede tener una secuencia de aminoácidos que corresponde a las secuencias de aminoácidos de la región marco conservada del polipéptidos de la SEC ID N°: 1.

50 En algunas realizaciones, el péptido aislado incluye adicionalmente un dominio de dimerización unido a la región C-terminal de un dominio variable de polipéptidos de cadena pesada. El dominio de dimerización puede ser un dominio de cremallera de leucina o una secuencia que tiene al menos un resto de cisteína. El dominio de dimerización tiene una región bisagra en algunas realizaciones. En otras realizaciones el dominio de dimerización es una sola cisteína.

55 En algunas realizaciones, el péptido aislado es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones es un anticuerpo biespecífico. Además como en otras realizaciones, el péptido aislado es un anticuerpo sintético.

De acuerdo con otra divulgación en el presente documento, se proporciona un anticuerpo anti-ABCB5 o fragmento de unión al antígeno del mismo. El anticuerpo tiene una región constante humana, en la que el anticuerpo anti-ABCB5 o fragmentos de unión al antígeno inhibe de forma competitiva la unión de 3C2-1D12 de mAb a ABCB5. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv, Fd, VH dAb, y VL dAb. En otras realizaciones el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es de la clase IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM de inmunoglobulina. Además, en otras realizaciones el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región humana constante una región de marco observada variable humana o el fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo de una sola cadena. Ten anticuerpo de una sola cadena es opcionalmente un anticuerpo camélido.

Un dominio variable de anticuerpo humanizado que tiene una región de unión al antígeno funcional se proporciona de acuerdo con otras divulgaciones el presente documento. El dominio variable de anticuerpo humanizado tiene CDR1-H1, CDR2-H2, CDR3-H3, CDR1-L1, CDR2-L2, y CDR3-L3 no humanos que tienen una homología de al menos un 90 % con CDR1-H1, CDR2-H2, CDR3-H3, CDR1-L1, CDR2-L2, y CDR3-L3 de 3C2-1D12 de mAb incorporado en un dominio variable de anticuerpo humano.

En otras divulgaciones en el presente documento, se proporciona un anticuerpo quimérico. El anticuerpo quimérico tiene un dominio variable que se une de forma específica a ABCB5 y un dominio constante, en el que el dominio variable y el dominio constante son de diferentes especies.

En algunas realizaciones, el péptido aislado tiene una secuencia de aminoácidos de un de unión CDR3-H3 a ABCB5 o variante funcionalmente equivalentes del mismo. En otras realizaciones el péptido aislado tiene una secuencia de aminoácidos de un CDR2-H2 de unión a ABCB5 o variante funcionalmente equivalente del mismo. En otras realizaciones el péptido aislado tiene una secuencia de aminoácidos de un CDR1-H1 de unión a ABCB5 o variante funcionalmente equivalente del mismo. En otras realizaciones el péptido aislado tiene una secuencia de aminoácidos de un CDR3-L3 de unión a ABCB5 o variante funcionalmente equivalente del mismo. En otras realizaciones el péptido aislado tiene una secuencia de aminoácidos de un CDR2-L2 de unión a ABCB5 o variante funcionalmente equivalente del mismo. Además, en otras realizaciones el péptido aislado tiene una secuencia de aminoácidos de un CDR1-L1 de unión a ABCB5 o variante funcionalmente equivalente del mismo.

En otras realizaciones el péptido aislado es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado puede ser opcionalmente un anticuerpo monoclonal soluble intacto. En otras realizaciones el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado es un fragmento de anticuerpo monoclonal aislado seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv, Fd, VH dAb, y VL dAb. Además, en otras realizaciones el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado aumentara quimiosensibilización. En una realización preferente el péptido aislado se une de forma selectiva a ABCB5. Además, en otras realizaciones el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado es un anticuerpo humanizado. El péptido aislado puede ser opcionalmente un scFv.

El péptido aislado en otras realizaciones se conjuga con una marca detectable.

La composición también puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente es una formulación estéril.

La presente invención no se limita en esta solicitud a los detalles de preparación y a la disposición de los componentes que se establecen en la siguiente descripción o se ilustran en las figuras. La invención es capaz de formar otras realizaciones y de ponerse en práctica por realizarse de diferentes maneras. Además, las expresiones y terminología usadas en el presente documento son para los fines de descripción y no se deberían contemplar como limitantes. El uso de "que incluye", "que comprende", o "que tiene", "que contiene", "que implica" y variaciones de los mismos en el presente documento, se refiere a que incluye los elementos indicados en lo sucesivo en el presente documento y equivalentes de los mismos así como elementos adicionales.

Breve descripción de las figuras

No se pretende que las figuras adjuntas se dibujen a escala. En las figuras, cada componente idéntico o casi idéntico que se ilustra en diversas figuras se representa mediante un número similar. Para fines de claridad, no todos los componentes se pueden marcar en cada figura. En las figuras:

La **Figura 1** es una serie de imágenes y gráficos que representan un análisis de micromatriz de tejido con evolución a melanoma para ABCB5 así como una caracterización de poblaciones de melanoma ABCB5⁺. La **Figura 1(a)** muestra un gráfico que ilustra un análisis mediante el Sistema Automatizado de Imágenes Celulares de Chromavision, que muestra diferencias significativas en las intensidades de la tinción de ABCB5 para nevus melanocítico fino y grueso, con respecto a melanomas primarios finos y gruesos, con respecto a metástasis de melanoma de ganglios linfáticos y viscerales (nevus fino o grueso con respecto a melanomas primarios finos o gruesos, o con respecto a metástasis en ganglios linfáticos o viscerales, todos los valores de $P < 0,001$; melanomas primarios finos con respecto a melanomas primarios gruesos $P = 0,004$; melanomas primarios finos y

gruesos con respecto metástasis en ganglios linfáticos, $P = 0,001$, metástasis en ganglios linfáticos con respecto a metástasis viscerales, $P = 0,025$). Las **Figuras 1(b-c)** representan varias caracterizaciones de poblaciones de melanoma ABCB5⁺. La **Figura 1(b)** representa un análisis de citometría de flujo en un solo color de muestras clínicas de melanoma para la expresión de ABCB5, CD20, Nestina, TIE-1, VE-cadherina, CD31, o BMPR1a. Se ilustra el % de células positivas para $n = 6$ pacientes con melanoma (las barras horizontales indican la expresión media). La **Figura 1(c)** muestra la expresión de ABCB5⁺ o ABCB5⁻ tal como se determina mediante citometría de flujo en color dual. El % de células positivas (media \pm ETM) se ilustra para $n = 3-6$ pacientes con melanoma.

La **Figura 2** es una serie de gráficos e imágenes que representan la tumorigenicidad *in vivo* de subconjuntos de células de melanoma ABCB5⁺ en modelos de xenoinjerto de tumor de ser humano al ratón. La **Figura 2(a)** (Panel a la Izquierda) es un gráfico que demuestra la capacidad de formación de tumor *in vivo* (%) de células de melanoma (US), ABCB5⁻, o ABCB5⁺ G3361 sin segregar después de xenotrasplante s.c. (10^7 , 10^6 , o 10^5 células/inóculo) en ratones NOD/SCID. El (Panel Central) es un gráfico que muestra el % de inoculados sin formación del tumor representado frente a los números de células inoculadas para células de melanoma (US), ABCB5⁻, o ABCB5⁺ G3361 sin segregar en ratones NOD/SCID, para la determinación de la Capacidad de Formación de Tumor de un 50 % (TF₅₀). El (Panel a la Derecha) muestran los volúmenes tumorales (media \pm ETM) de xenoinjertos de melanoma primario 8 semanas después del xenotrasplante s.c. en ratones NOD/SCID de células de melanoma (US), ABCB5⁻, o ABCB5⁺ G3361 (10^7 /inóculo). La **Figura 2(b)** (Panel a la Izquierda) es un gráfico que muestra la capacidad de formación del tumor *in vivo* (%) de células de melanoma (US), ABCB5⁻, o ABCB5⁺ A375 sin segregar después de xenotrasplante s.c. (2×10^6 , 2×10^5 , o 2×10^4 células/inóculo) en ratones NOD/SCID. El (Panel Central) representa el % de inóculos sin formación de tumor representado frente a los números de células inoculadas para células de melanoma (US), ABCB5⁻, o ABCB5⁺ A375 sin segregar en ratones NOD/SCID, la determinación de la Capacidad de Formación de Tumor de un 50 % (TF₅₀). El (Panel a la Derecha) muestra los volúmenes tumorales (media \pm ETM) de xenoinjertos de melanoma primario 5 semanas después del xenotrasplante s.c. en ratones NOD/SCID de células de melanoma (US), ABCB5⁻, o ABCB5⁺ A375 sin segregar (2×10^6 /inóculo). La **Figura 2(c)** (Panel a la Izquierda) muestra la inmunohistoquímica para la expresión de ABCB5 en un xenoinjerto representativo derivado de células de melanoma primario sin segregar en ratones NOD/SCID, que ilustra tres zonas separadas delimitadas con líneas de puntos: ABCB5⁻/negativo para melanina (parte superior izquierda del panel), ABCB5⁺/positivo para melanina (parte superior derecha del panel), y ABCB5⁺/negativo para melanina (mitad inferior del panel). El (Panel a la Derecha) es una serie de imágenes de tinción de doble inmunofluorescencia de secciones de xenoinjerto de melanoma congelado para coexpresión de ABCB5 (FITC) y VE-cadherina (Rojo Texas). Los núcleos se visualizan mediante tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, azul). La **Figura 2(d)** es un gráfico que representa la capacidad de formación de tumor secundario (%) en ratones NOD/SCID de células ABCB5⁻ o ABCB5⁺ (10^7 /inóculo) aisladas a partir de tumores primarios derivados de células de melanoma ABCB5⁺. La **Figura 2(e)** contiene los gráficos que representan la capacidad de formación de tumor *in vivo* (%) (panel de la izquierda) y los volúmenes tumorales (media \pm ETM, panel a la derecha) de células de melanoma recientes derivadas de paciente (US), ABCB5⁻ o ABCB5⁺ sin segregar (10^6 /inóculo) 8 semanas después del xenotrasplante s.c. en ratones NOD/SCID.

La **Figura 3** representa el seguimiento de la tumorigenicidad *in vivo*, autorrenovación y diferenciación de células de melanoma ABCB5⁺ humano en receptores de ratón NOD/SCID. La **Figura 3(a)** (Paneles a la Izquierda) muestra la citometría de flujo en color dual (representaciones puntuales de FI1 (EYFP) con respecto a F12 (DsRed2)) de un inóculo de células tumorales que consiste en células ABCB5⁺ G3361 al 10 %/DsRed2 y células ABCB5⁻ G3361 al 90 %/EYFP antes del xenotrasplante (se muestra en el panel grande). Los controles (se muestran en paneles pequeños) son células de melanoma humano G3361 no transfectadas (parte superior), células G3361/DsRed2 (parte media), y células G3361/EYFP (parte inferior). Los (Paneles a la Derecha) muestran la citometría de flujo en color dual (representaciones puntuales de FI1 (EYFP) con respecto a F12 (DsRed2)) de un tumor de xenoinjerto disociado formado 6 semanas después de la inoculación de células ABCB5⁺ G3361 al 10 %/DsRed2 y células ABCB5⁻ G3361 al 90 %/EYFP (se muestra en el panel grande). Los controles (se muestran en paneles pequeños) son células de melanoma humano G3361 no transfectadas (parte superior), células G3361/DsRed2 (parte media), células G3361/EYFP (parte inferior). La **Figura 3(b)** es un gráfico del porcentaje medio (media \pm ETM) de células DsRed2⁺ (% de DsRed2⁺ / (% de DsRed2⁺ + % de EYFP⁺) x 100) de origen de ABCB5⁺ o de células EYFP⁺ (% de EYFP⁺ / (% de DsRed2⁺ + % de EYFP⁺) x 100) de origen de ABCB5⁻ representado frente a las semanas después de la inoculación de células de melanoma para tumores *in vivo* resultantes a $t = 4$ o 6 semanas ($n = 3$ replicados, respectivamente) y los respectivos y inóculos de células xenoinjertadas ($n = 6$). La **Figura 3(c)** es una serie de imágenes de microscopía de fluorescencia en canal dual de células G3361/DsRed2 y células G3361/EYFP (filas de la parte superior y central) y de una sección del tejido congelado (fila inferior) derivada de tumores formados *in vivo* 6 semanas después del xenotrasplante s.c. en ratones NOD/SCID de inóculos de células G3361 al 10 %/DsRed2 ABCB5⁺ y células G3361 al 90 %/EYFP ABCB5⁻. Los paneles a la izquierda muestran el campo brillante, los paneles en la parte media izquierda muestran DsRed2 (origen de ABCB5⁺), los paneles en la parte media derecha muestran EYFP (origen de ABCB5⁻), y los paneles en la parte más a la derecha muestran imágenes mezcladas (tamaño de las barras: 25 μ m). La **Figura 3(d)** (Paneles a la Izquierda) representa el análisis de citometría de flujo de la expresión de DsRed2 y EYFP en células ABCB5⁺ (parte superior) y en células ABCB5⁻ (parte inferior) derivadas de tumores formados en ratones NOD/SCID 6 semanas después de la inoculación de células ABCB5⁺ G3361 al 10 %/DsRed2 y células ABCB5⁻ G3361 al 90 %/ EYFP. El (Panel a la Derecha) es un gráfico que representa el porcentaje medio (media \pm SD) de cualquiera de las células fluorescentes DsRed2 o EYFP (calculado como %

de $DsRed2^+$ / (% de $DsRed2^+$ + % de $EYFP^+$) x 100 o % de $EYFP^+$ / (% de $DsRed2^+$ + % de $EYFP^+$) x 100, respectivamente) en subconjuntos de células ABCB5⁺ y ABCB5⁻ derivadas de $n = 3$ tumores replicados.

La **Figura 4** es una serie de gráficos e imágenes que representan el análisis del efecto de mAb de ABCB5 en el crecimiento del xenoinjerto de melanoma. La **Figura 4(a)** es un gráfico que mide los volúmenes del tumor (media

± ETM) de xenoinjertos de melanoma representados frente a los días después de la inoculación de células de melanoma s.c. en ratones atímicos Balb/c (10^7 células/inóculo) para animales sin tratar ($n = 18$), tratados con mAb de control de isotipo ($n = 10$), o tratados con mAb anti-ABCB5 ($n = 11$). [Los días de administración de mAb i.p. se indican con flechas]. La **Figura 4(b)** es un gráfico que mide la tasa de formación de tumor (%) 58 días después de la inoculación de células de melanoma s.c. en ratones atímicos Balb/c (10^7 células/inóculo) en

animales sin tratar ($n = 18$), tratados con mAb de control de isotipo ($n = 10$), o tratados con mAb anti-ABCB5 ($n = 11$). La **Figura 4(c)** representa la inmunohistoquímica de ABCB5 (panel a la izquierda) y la histología convencional (H&E) (panel a la derecha) de xenoinjertos de melanoma humano en ratones atímicos. (Los paneles representan secciones adyacentes). Las regiones de ABCB5⁺ se segregan con áreas sin melanizar (a la izquierda de la línea de puntos central), mientras que las regiones de ABCB5⁻ se correlacionan con regiones que muestran melanización con partículas de color marrón-negro (a la derecha de la línea de puntos central). La

Figura 4(d) muestra el análisis de citometría de flujo (FITC, FI1) para anticuerpo unido a la superficie en xenoinjertos de melanoma, 1 día después de la administración i.p. de mAb anti-ABCB5 (línea sólida) o mAb de control de isotipo (sombreado). Un xenoinjerto de melanoma representativo aislado de un ratón tratado con mAb anti-ABCB5 presentaba un 20,5 % de carácter positivo en comparación con unos derivados de un animal tratado con control de isotipo. La **Figura 4(e)** resume una evaluación de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) mediante citometría de flujo en color dual en cultivos de células diana de melanoma tratadas con mAb anti-ABCB5, o tratadas con mAb de control de isotipo o marcadas con DiO sin tratar

contrateñidas con yoduro de propidio (PI) después de cocultivo de 24 h con células inmunes efectoras sin marcar derivadas de vasos de ratón atímico Balb/c (proporciones de diana con respecto a efector a 1:40). Los (Paneles a la izquierda) son una serie de resultados representativos de citometría de flujo en color dual de ADCC con diana DIO⁺PI⁺ lisadas encontradas en los cuadrantes de la parte superior derecha de cocultivos diana/efectores

tratados con mAb anti-ABCB5 (parte superior), tratados con mAb de control de isotipo (parte central), o sin tratar con Ab (parte inferior). El (panel de la derecha) representa un análisis de ADCC (% de media ± ETM) en $n = 6$ experimentos por replicado en grupos de tratamiento tal como se ha ilustrado anteriormente ([ADCC (%) = (porcentaje de positividad para la muestra de DIO⁺PI⁺) - (porcentaje medio de positividad para la muestra de DIO⁺PI⁺ sin tratar con Ab))].

La **Figura 5** resume la caracterización de células de melanoma humano ABCB5⁺, o ABCB5⁻ sin segregar antes del xenotrasplante. La **Figura 5(a)** representa la expresión de ABCB5 superficial de citometría de flujo o tinción de control representativa (FITC, FI1) representada con respecto a la dispersión frontal (FSC) determinado o en cultivos sin segregar de células de melanoma A375 humano. La **Figura 5(b)** representa el análisis de citometría de flujo en un solo color representativo de la viabilidad celular para células de melanoma humano sin segregar (paneles a la izquierdas), ABCB5⁺ (paneles centrales) y ABCB5⁻ (paneles a la derecha) tal como se determina mediante la incorporación celular y la activación enzimática del colorante fluorescente, calceína-AM. Los paneles de la parte superior representan muestras de calceína-AM, los paneles de la parte inferior representan controles sin calceína-AM. Las células viables se encuentran en las ventanas de análisis R1 de las representaciones de FSC con respecto a FI2. La **Figura (c)** es un gráfico que muestra la expresión de ABCB5 de células de melanoma humano (ABCB5⁻) G3361 sin segregar y ABCB5⁺ purificadas o ABCB5⁺ suprimidas.

La **Figura 6** es un gráfico que resume el análisis de correlación de la expresión genética relativa de ABCB5 con tiempos de duplicación del cultivo celular de melanoma. La correlación de Pearson de la expresión genética relativa de ABCB5 determinada mediante RT-PCR en tiempo real (media ± SD, $n = 3$ experimentos independientes) y los tiempos de duplicación del cultivo de 10 líneas celulares de melanoma (1, LOX IMVI; 2, SK-MEL-5; 3, M14; 4, A375; 5, G3361; 6, UACC-62; 7, SK-MEL-28; 8, UACC-257; 9, SK-MEL-2; 10, MALME-3M); r es el coeficiente de correlación de Pearson.

La **Figura 7** es un gel que representa bandas de ADNc que se produjeron a partir de las regiones variables (VR) de cadena pesada (HC) y de cadena ligera (LC) del ARN mediante transcripción inversa. Los productos de PCR de VR tanto para HC como para LC se clonaron en el vector de secuenciación pCR2.1 de Invitrogen y se transformaron en células TOP10.

La **Figura 8** es la secuencia de aminoácidos de VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 9** es la secuencia de nucleótidos de VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 10** es la secuencia de aminoácidos de VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 11** es la secuencia de nucleótidos de VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 12** es la secuencia de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 13** es la secuencia de nucleótidos de cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 5** resume la caracterización de células de melanoma humano ABCB5⁺, o ABCB5⁻ sin segregar antes del xenotrasplante. La **Figura 5(a)** representa la expresión de ABCB5 superficial de citometría de flujo o tinción de control representativa (FITC, FI1) representada con respecto a la dispersión frontal (FSC) determinado o en cultivos sin segregar de células de melanoma A375 humano. La **Figura 5(b)** representa el análisis de citometría de flujo en un solo color representativo de la viabilidad celular para células de melanoma humano sin segregar (paneles a la izquierdas), ABCB5⁺ (paneles centrales) y ABCB5⁻ (paneles a la derecha) tal como se determina mediante la incorporación celular y la activación enzimática del colorante fluorescente, calceína-AM. Los paneles de la parte superior representan muestras de calceína-AM, los paneles de la parte inferior representan controles sin calceína-AM. Las células viables se encuentran en las ventanas de análisis R1 de las representaciones de FSC con respecto a FI2. La **Figura (c)** es un gráfico que muestra la expresión de ABCB5 de células de melanoma humano (ABCB5⁻) G3361 sin segregar y ABCB5⁺ purificadas o ABCB5⁺ suprimidas.

La **Figura 6** es un gráfico que resume el análisis de correlación de la expresión genética relativa de ABCB5 con tiempos de duplicación del cultivo celular de melanoma. La correlación de Pearson de la expresión genética relativa de ABCB5 determinada mediante RT-PCR en tiempo real (media ± SD, $n = 3$ experimentos independientes) y los tiempos de duplicación del cultivo de 10 líneas celulares de melanoma (1, LOX IMVI; 2, SK-MEL-5; 3, M14; 4, A375; 5, G3361; 6, UACC-62; 7, SK-MEL-28; 8, UACC-257; 9, SK-MEL-2; 10, MALME-3M); r es el coeficiente de correlación de Pearson.

La **Figura 7** es un gel que representa bandas de ADNc que se produjeron a partir de las regiones variables (VR) de cadena pesada (HC) y de cadena ligera (LC) del ARN mediante transcripción inversa. Los productos de PCR de VR tanto para HC como para LC se clonaron en el vector de secuenciación pCR2.1 de Invitrogen y se transformaron en células TOP10.

La **Figura 8** es la secuencia de aminoácidos de VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 9** es la secuencia de nucleótidos de VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 10** es la secuencia de aminoácidos de VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 11** es la secuencia de nucleótidos de VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 12** es la secuencia de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 13** es la secuencia de nucleótidos de cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 5** resume la caracterización de células de melanoma humano ABCB5⁺, o ABCB5⁻ sin segregar antes del xenotrasplante. La **Figura 5(a)** representa la expresión de ABCB5 superficial de citometría de flujo o tinción de control representativa (FITC, FI1) representada con respecto a la dispersión frontal (FSC) determinado o en cultivos sin segregar de células de melanoma A375 humano. La **Figura 5(b)** representa el análisis de citometría de flujo en un solo color representativo de la viabilidad celular para células de melanoma humano sin segregar (paneles a la izquierdas), ABCB5⁺ (paneles centrales) y ABCB5⁻ (paneles a la derecha) tal como se determina mediante la incorporación celular y la activación enzimática del colorante fluorescente, calceína-AM. Los paneles de la parte superior representan muestras de calceína-AM, los paneles de la parte inferior representan controles sin calceína-AM. Las células viables se encuentran en las ventanas de análisis R1 de las representaciones de FSC con respecto a FI2. La **Figura (c)** es un gráfico que muestra la expresión de ABCB5 de células de melanoma humano (ABCB5⁻) G3361 sin segregar y ABCB5⁺ purificadas o ABCB5⁺ suprimidas.

La **Figura 6** es un gráfico que resume el análisis de correlación de la expresión genética relativa de ABCB5 con tiempos de duplicación del cultivo celular de melanoma. La correlación de Pearson de la expresión genética relativa de ABCB5 determinada mediante RT-PCR en tiempo real (media ± SD, $n = 3$ experimentos independientes) y los tiempos de duplicación del cultivo de 10 líneas celulares de melanoma (1, LOX IMVI; 2, SK-MEL-5; 3, M14; 4, A375; 5, G3361; 6, UACC-62; 7, SK-MEL-28; 8, UACC-257; 9, SK-MEL-2; 10, MALME-3M); r es el coeficiente de correlación de Pearson.

La **Figura 7** es un gel que representa bandas de ADNc que se produjeron a partir de las regiones variables (VR) de cadena pesada (HC) y de cadena ligera (LC) del ARN mediante transcripción inversa. Los productos de PCR de VR tanto para HC como para LC se clonaron en el vector de secuenciación pCR2.1 de Invitrogen y se transformaron en células TOP10.

La **Figura 8** es la secuencia de aminoácidos de VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 9** es la secuencia de nucleótidos de VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 10** es la secuencia de aminoácidos de VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 11** es la secuencia de nucleótidos de VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 12** es la secuencia de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 13** es la secuencia de nucleótidos de cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 5** resume la caracterización de células de melanoma humano ABCB5⁺, o ABCB5⁻ sin segregar antes del xenotrasplante. La **Figura 5(a)** representa la expresión de ABCB5 superficial de citometría de flujo o tinción de control representativa (FITC, FI1) representada con respecto a la dispersión frontal (FSC) determinado o en cultivos sin segregar de células de melanoma A375 humano. La **Figura 5(b)** representa el análisis de citometría de flujo en un solo color representativo de la viabilidad celular para células de melanoma humano sin segregar (paneles a la izquierdas), ABCB5⁺ (paneles centrales) y ABCB5⁻ (paneles a la derecha) tal como se determina mediante la incorporación celular y la activación enzimática del colorante fluorescente, calceína-AM. Los paneles de la parte superior representan muestras de calceína-AM, los paneles de la parte inferior representan controles sin calceína-AM. Las células viables se encuentran en las ventanas de análisis R1 de las representaciones de FSC con respecto a FI2. La **Figura (c)** es un gráfico que muestra la expresión de ABCB5 de células de melanoma humano (ABCB5⁻) G3361 sin segregar y ABCB5⁺ purificadas o ABCB5⁺ suprimidas.

La **Figura 6** es un gráfico que resume el análisis de correlación de la expresión genética relativa de ABCB5 con tiempos de duplicación del cultivo celular de melanoma. La correlación de Pearson de la expresión genética relativa de ABCB5 determinada mediante RT-PCR en tiempo real (media ± SD, $n = 3$ experimentos independientes) y los tiempos de duplicación del cultivo de 10 líneas celulares de melanoma (1, LOX IMVI; 2, SK-MEL-5; 3, M14; 4, A375; 5, G3361; 6, UACC-62; 7, SK-MEL-28; 8, UACC-257; 9, SK-MEL-2; 10, MALME-3M); r es el coeficiente de correlación de Pearson.

La **Figura 7** es un gel que representa bandas de ADNc que se produjeron a partir de las regiones variables (VR) de cadena pesada (HC) y de cadena ligera (LC) del ARN mediante transcripción inversa. Los productos de PCR de VR tanto para HC como para LC se clonaron en el vector de secuenciación pCR2.1 de Invitrogen y se transformaron en células TOP10.

La **Figura 8** es la secuencia de aminoácidos de VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 9** es la secuencia de nucleótidos de VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 10** es la secuencia de aminoácidos de VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 11** es la secuencia de nucleótidos de VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 12** es la secuencia de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12. La **Figura 13** es la secuencia de nucleótidos de cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 5** resume la caracterización de células de melanoma humano ABCB5⁺, o ABCB5⁻ sin segregar antes del xenotrasplante. La **Figura 5(a)** representa la expresión de ABCB5 superficial de citometría de flujo o tinción de control representativa (FITC, FI1) representada con respecto a la dispersión frontal (FSC) determinado o en cultivos sin segregar de células de melanoma A375 humano. La **Figura 5(b)** representa el análisis de citometría de flujo en un solo color representativo de la viabilidad celular para células de melanoma humano sin segregar (paneles a la izquierdas), ABCB5⁺ (paneles centrales) y ABCB5⁻ (paneles a la derecha) tal como se determina mediante la incorporación celular y la activación enzimática del colorante fluorescente, calceína-AM. Los paneles de la parte superior representan muestras de calceína-AM, los paneles de la parte inferior representan controles sin calceína-AM. Las células viables se encuentran en las ventanas de análisis R1 de las representaciones de FSC con respecto a FI2. La **Figura (c)** es un gráfico que muestra la expresión de ABCB5 de células de melanoma humano (ABCB5⁻) G3361 sin segregar y ABCB5⁺ purificadas o ABCB5⁺ suprimidas.

60 Descripción detallada

Se han identificado células que inician tumores capaces de autorrenovación y diferenciación, que son responsables del crecimiento del tumor en neoplasias hematológicas y cánceres sólidos en seres humanos. Si tales poblaciones minoritarias están asociadas con la evolución del tumor en pacientes humanos, el direccionamiento específico de las células que inician el tumor podría proporcionar una nueva estrategia para erradicar cánceres actualmente resistentes a la terapia sistémica. Se ha identificado una subpoblación enriquecida para células que inician cáncer

maligno humano, definida por la expresión del mediador de quimiorresistencia a ABCB5. Como se muestra en los Ejemplos indicados más adelante, el direccionamiento específico de esta población minoritaria tumorigénica anula el crecimiento tumoral.

5 Recientemente, los inventores clonaron y caracterizaron ABCB5, un nuevo transportador de resistencia a múltiples fármacos humanos, que se muestra que se expresa preferentemente por células de linaje melanocítico. La inhibición de ABCB5 hace que las células de melanoma normalmente resistentes sean susceptibles a la doxorubicina. Los inventores han demostrado que la expresión de ABCB5 1) marca las células de melanoma tumorigénicas de fenotipo y función de células madre; y 2) el direccionamiento específico del compartimento de células madre de melanoma
10 ABCB5⁺ constituye un nuevo enfoque celular dirigido por células madre altamente prometedor para el tratamiento del melanoma. Los datos se describen con más detalle en la sección de Ejemplos.

Además, en experimentos de xenotrasplante de ser humano a ratón, las células de melanoma ABCB5⁺ tenían mayor capacidad tumorigénica que las poblaciones en masa de ABCB5⁻. Por otra parte, el seguimiento *in vivo* del destino celular genético demostró que las células cancerígenas ABCB5⁺ tumorigénicas eran capaces de generar progenie de ABCB5⁺ y ABCB5⁻, mientras que las células ABCB5⁻ daban lugar exclusivamente a progenie de ABCB5⁻. Esta identificación de una relación específica entre un mecanismo de quimiorresistencia y células madre cancerígenas en una neoplasia humana tiene implicaciones importantes para los enfoques dirigidos por células madre para terapia
15 para el cáncer.

También se ha descubierto que la anulación de las células de melanoma ABCB5⁺ mediante enfoques inmunoterapéuticos dirigidos puede representar una nueva estrategia para conseguir respuestas clínicas más duraderas que las obtenidas con estrategias terapéuticas dirigidas predominantemente al grueso de la población de células tumorales. Por lo tanto, los inventores investigaron si la anulación selectiva de células madre de melanoma ABCB5⁺ humano tumorigénicas, quimiorresistentes mediante la administración sistémica de un anticuerpo monoclonal anti-ABCB5 (clon 3C2-1 D 12 de mAb) facilita la inhibición de la formación de tumor/erradicación del tumor en un modelo animal preclínico relevante de melanoma maligno humano que implica xenoinjertos tumorales de ser humano a ratón atímico.
20

Tal como se muestra con más detalle a continuación, los inventores examinaron la biodisponibilidad y la eficacia/especificidad de unión melanoma de mAb anti-ABCB5 administrado *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de melanoma de ser humano a ratón. Con el fin de examinar si la administración de mAb anti-ABCB5 da como resultado niveles en suero *in vivo* detectables, se incubaron sueros de ratón con cultivos de células de melanoma humano recién cosechadas, seguido de contratinción de células con Ab secundario de Ig de cabra anti-ratón conjugado con FITC y posterior análisis mediante citometría de flujo de un solo color. Se observó una unión significativa de Ab secundario de Ig de cabra anti-ratón conjugado con FITC para los cultivos de melanoma incubados previamente con sueros a todas las diluciones sometidas a ensayo derivadas de ratones tratados con mAb anti-ABCB5. No se observó unión con sueros derivados de animales tratados de control de isotipo o sin tratar. La detección de una positividad para ABCB5 de un 5,4 % a las diluciones de sueros tan bajas como a 1:100 (Figura 1A) era coherente con la frecuencia de células ABCB5⁺ informada anteriormente entre células de melanoma G3361 cultivadas *in vitro* (Frank, N. Y. *et al.* ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 65, 4320-33 (2005); Frank, N. Y. *et al.* Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* 278, 47156-65 (2003)). Estos hallazgos demuestran que el mAb anti-ABCB5 administrado de forma sistémica da como resultado niveles en suero de mAb *in vivo* eficaces. Los datos que se describen en el presente documento demuestran adicionalmente que el mAb anti-ABCB5 administrado de forma sistémica se une de forma eficaz y preferente a células de melanoma humano ABCB5⁺ xenoinjertado *in vivo*, lo que proporciona una evidencia de su idoneidad para enfoques de direccionamiento terapéutico *in vivo*. Usando xenoinjertos de células de melanoma humano en ratones atímicos, se demostró que el direccional y específico del compartimento de células madre de melanoma ABCB5⁺ con anticuerpos era un enfoque dirigido por células madre eficaz para el tratamiento del melanoma.
30
35
40
45
50

La invención se basa en parte en el descubrimiento, aislamiento y caracterización de moléculas de unión a ABCB5, tales como anticuerpos monoclonales humanos que se unen a ABCB5 y son útiles en el tratamiento del cáncer. El ABCB5 es un transportador de resistencia a múltiples fármacos que está presente en las células madre cancerígenas.
55

Por lo tanto, las composiciones que se describen en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento de un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener cáncer. Un sujeto hará referencia a un ser humano o vertebrado mamífero que incluye, pero no se limita a, un perro, gato, caballo, cabra y primate, por ejemplo, mono. Por lo tanto, las composiciones que se describen en el presente documento también se pueden usar para tratar enfermedades o afecciones en sujetos no humanos. Por ejemplo, el cáncer es una de las causas principales de muerte en los animales de compañía (por ejemplo, gatos y perros). Preferentemente, el sujeto es un ser humano.
60

Como se usa en el presente documento, el término tratar, tratado, o que trata cuando se usa con respecto a un trastorno como el cáncer se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto al desarrollo de la enfermedad o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad, así
65

como un tratamiento después de que el sujeto haya desarrollado la enfermedad con el fin de luchar contra la enfermedad, evitar que la enfermedad empeore, o retrasar la evolución de la enfermedad en comparación con la ausencia de la terapia.

5 Un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer es el que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia se ha demostrado que tiene una relación correlativa con una mayor probabilidad de desarrollar un cáncer y sujetos expuestos a agentes que causan cáncer tales como tabaco, asbesto, u otras toxinas químicas, o un sujeto que se ha tratado previamente para el cáncer y está en remisión aparente. Un sujeto en riesgo de padecer cáncer también incluye un sujeto que tiene
10 lesiones precancerígenas. Una lesión precancerígena es una zona de tejido que tiene propiedades alteradas y porta el riesgo de convertirse en cáncer de piel. Las lesiones precancerígenas pueden ser causadas, por ejemplo, por radiación UV, genética, exposición a agentes carcinógenos tales como arsénico, alquitrán o radiación de rayos x.

15 Un sujeto que tiene un cáncer es un sujeto que tiene células cancerígenas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Los cánceres o tumores incluyen, pero no se limitan a, cáncer del tracto biliar; cáncer de cerebro; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y no microcítico); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. Preferentemente, el cáncer incluye células madre cancerígenas que expresan ABCB5.

25 Opcionalmente, antes del tratamiento, la presencia de células madre positivas para ABCB5 se puede detectar usando las moléculas de unión que se describen en el presente documento. Los métodos de detección o diagnóstico proporcionados por lo general implican poner en contacto una o más moléculas con una muestra en o de un sujeto. Preferentemente, la primera muestra se extrae del sujeto, aunque también se contemplan métodos de detección *in vivo*. La muestra puede incluir cualquier tejido o fluido corporal que se sospecha que alberga células madre cancerígenas. Por ejemplo, las células madre se encuentran normalmente en o alrededor de la masa tumoral.

30 En el presente documento se desvelan moléculas tales como péptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y moléculas pequeñas. Las moléculas se unen a ABCB5 y aumentan la eliminación del tumor. En el presente documento, las moléculas de unión se denominan moléculas aisladas que se unen de forma selectiva a ABCB5. Se debe observar que tales anticuerpos son capaces de unirse a ABCB5 independientemente de su fuente. Por consiguiente, los anticuerpos se definen como por unión, por ejemplo, a ABCB5 de células de melanoma y porque
35 son capaces de detectar y/o mejorar los efectos antitumorales, por ejemplo, en células del melanoma, así como en otros tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama.

Aunque no se pretende quedar ligado por ninguna teoría particular, se cree que el tratamiento de tumores y cánceres puede fallar porque las células madre tumorigénicas no están dirigidas de manera eficaz por los
40 tratamientos convencionales. Las moléculas de unión a ABCB5 se dirigen de forma específica y están implicadas en la destrucción de estas células. Por lo tanto, cuando se usan estas moléculas solas o en combinación con terapias convencionales se pueden eliminarlas más agresivas del tumor.

45 Hay varios posibles mecanismos mediante los cuales el tratamiento con mAb anti-ABCB5 puede inhibir el crecimiento tumorigénico *in vivo* y la viabilidad tumoral de xenoinjertos de melanoma humano en este modelo de ratón atímico receptor, que incluye citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad mediada por complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por macrófago dependiente de anticuerpo (ABMC), y/o inhibición o función de ABCB5, que puede contribuir a la tumorigenicidad de las células madre. Se predice que cualquiera de estos mecanismos se dirige solamente al subconjunto de células tumorales que expresan
50 ABCB5 en comparación con los controles. Los inventores también esperan el direccionamiento terapéutico *in vivo* de mAb mediado por anti-ABCB5 de las células madre de melanoma ABCB5⁺ a través de estrategias de anulación celular mediada por quimiosensibilización o inmunotoxina. Dado que la administración de toxinas dirigidas por ABCB5 (toxinas químicas o biológicas, radionúclidos) o de los ARNsⁱ conjugados con mAb de ABCB5 hacia dianas genéticas específicas de células madre tumorales adicionales podría requerir internalización de toxina interna, los inventores también examinaron la internalización celular de mAb anti-ABCB5 después de la unión superficial a
55 células de melanoma humano ABCB5⁺. Los resultados indican que las toxinas conjugadas con mAb anti-ABCB5 se pueden administrar de forma específica a compartimentos intracelulares en células de melanoma humano ABCB5⁺ quimiorresistentes, destacando una ventaja terapéutica de este nuevo enfoque para el tratamiento de melanoma clínico y otros cánceres.

60 Una molécula que se une de forma selectiva a ABCB5 como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula, por ejemplo, molécula pequeña, péptido, anticuerpo, fragmento, que interactúa con ABCB5 y, opcionalmente, interfiere con la actividad ABCB5. En algunas realizaciones, las moléculas son péptidos.

65 Los péptidos comprenden mínimamente regiones que se unen a ABCB5. Las regiones de unión a ABCB5, en algunas realizaciones se derivan de las regiones de unión a ABCB5 de los anticuerpos, o como alternativa, son variantes funcionalmente equivalentes de tales regiones. Por consiguiente, dos clases particularmente importantes

de regiones de unión a ABCB5 derivadas de anticuerpo son regiones variables y CDR de los anticuerpos que se describen en el presente documento. Los ácidos nucleicos de CDR y de región variable se pueden clonar a partir de células que producen anticuerpos o se pueden preparar de forma sintética basándose en las secuencias que se describen en el presente documento.

5 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en su sentido más amplio y cubre de forma específica anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpo, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada, y moléculas similares a anticuerpo tales como scFv. Un anticuerpo nativo
10 normalmente se refiere a glicoproteínas heterotetraméricas formadas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada y ligera tiene puentes disulfuro intracadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los restos de aminoácidos en particular forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

20 Ciertas partes de los dominios variables difieren en gran medida en las secuencias entre y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres o cuatro segmentos denominados "regiones que determinan la complementariedad" (CDR) o "regiones hipervariables" en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan en la región de marco conservada (FR). Cada uno de los dominios variables de
25 cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro o cinco regiones FR, que en gran medida adoptan una configuración de lámina β , conectada por las CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por las regiones de FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen en la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Publ. del NIH N° 91-3242, Vol. I, páginas 647-669 (1991)). Los dominios constantes no están necesariamente implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan
30 diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

35 Una región hipervariable o CDR como se usa en el presente documento define una subregión dentro de la región variable de variabilidad de secuencias extrema del anticuerpo, que forma el sitio de unión al antígeno y son los determinantes principales de la especificidad del antígeno. De acuerdo con una definición, pueden ser los restos (nomenclatura de Kabat) 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la región variable de cadena ligera y los restos (nomenclatura de Kabat 31-35 (H1), 50-65 (H2), 95-102 (H3) en la región variable de cadena pesada. Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. [1991]).

45 Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y los dominios constantes de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia narrativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia narrativa humana) o variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente con el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)).
50 Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpo. Como alternativa, los fragmentos de Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se pueden acoplar de forma química para formar fragmentos de $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos de $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente a partir de cultivos de células
55 hospedadoras recombinantes.

60 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; moléculas de anticuerpos de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento de $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y además es capaz de reticulación con el antígeno.

65

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión del antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada en asociación no covalente y estrecha. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio radial interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. De forma colectiva, las seis CDR confieren una especificidad de unión al antígeno con respecto al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En el presente documento, Fab'-SH es la denominación para Fab' en la que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Originalmente se produjeron fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ como precursores de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

La expresión "región Fc" se usa para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que se puede generar mediante digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región de Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana normalmente se definen para el tramo de un resto de aminoácidos aproximadamente en la posición de Cys226, o aproximadamente en la posición de Pro230, con respecto al extremo carboxilo de la región Fc. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. En el presente documento, por "cadena de la región Fc" se hace referencia a una de las dos cadenas de polipéptidos de una región Fc.

"Región bisagra", y variaciones de la misma, como se usa en el presente documento, incluye el significado que se conoce en la técnica, que se ilustra, por ejemplo, en Janeway *et al.*, *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4ª ed., 1999)

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, and y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Se conocen bien las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Preferentemente, los péptidos de unión a ABCB5 incluyen de forma mínima al menos una CDR de las que se describen en el presente documento o las que se pueden derivar de las secuencias que se describen en el presente documento. Como se usa en el presente documento, una CDR de unión a ABCB5 es una CDR que se describe en el presente documento. La región de unión a ABCB5 puede ser una CDR1 de unión a ABCB5, una CDR2 de unión a ABCB5, o una CDR3 de unión a ABCB5, todas las cuales se derivan de los anticuerpos y cadenas variables de anticuerpos que se desvelan en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, una "CDR1 de unión a ABCB5" es una CDR1 que se une, preferentemente de forma específica, a ABCB5, y se deriva de cualquiera de las regiones variables de cadena pesada o ligera de los anticuerpos que se describen en el presente documento. Puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEC ID N°: 3 y la SEC ID N°: 6. Una "CDR2 de unión a ABCB5" es una CDR2 que se une, preferentemente de forma específica, a ABCB5, y se deriva de cualquiera de las regiones variables de cadena pesada o ligera de los anticuerpos que se describen en el presente documento. Puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la grupo que consiste en la SEC ID N°: 4 y la SEC ID N°: 7. Una "CDR3 de unión a ABCB5" es una CDR3 que se une, preferentemente de forma específica, a ABCB5, y se deriva de cualquiera de las regiones variables de cadena pesada o ligera de los anticuerpos que se describen en el presente documento. Puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEC ID N°: 5 y la SEC ID N°: 8.

Además de las secuencias que se enumeran en el presente documento, se incorporan variantes funcionalmente equivalentes de estas secuencias que incluyen variantes de sustitución conservativa ya sea en la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, como se describe con más detalle a continuación.

Los péptidos son útiles, entre otros, en métodos de diagnóstico dirigidos a detectar, en una muestra o de un sujeto, el antígeno de ABCB5 o las células que expresan ABCB5. A un mínimo, los péptidos útiles en estos métodos solo

necesitan reconocer y unirse a ABCB5, independientemente de si también aumenta la eliminación del tumor. Los anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en análisis de diagnóstico FACS, transferencia de Western, e inmunohistoquímica. Tales anticuerpos también se pueden usar para usos de diagnóstico *in vivo*, en los que los mAb conjugados con marca se pueden usar para evaluar la carga tumoral, la localización del tumor o la masa tumoral residual después de quimioterapia o terapia quirúrgica de tumores que expresan ABCB5. En realizaciones importantes, los anticuerpos y fragmentos de los mismos se unen a ABCB5 de forma selectiva. En algunas realizaciones, solamente poseen una o más de las CDR derivadas de los clanes de anticuerpo que se describen en el presente documento. En realizaciones preferentes, los péptidos comprenden una CDR3 de unión a ABCB5, e incluso más preferentemente, los péptidos comprenden una CDR3 de unión a ABCB5 de cadena pesada. Se debe entender que no todas las CDR son necesarias para efectuar la unión a la ABCB5. Sin embargo, en algunas realizaciones, los péptidos comprenden todas las CDR de un clon de anticuerpo dado que se desvela en el presente documento.

Además, se debería entender que se incorpora el intercambio de las CDR entre las regiones variables que se siguen en el presente documento. Preferentemente, una CDR de cadena pesada se intercambia con otra región CDR variable de cadena pesada, y del mismo modo, una CDR de cadena ligera se intercambia con otra región CDR variable de cadena ligera.

Los péptidos también pueden comprender una región variable de unión a ABCB5. Una región variable de unión a ABCB5 es una región variable (preferentemente una región variable de anticuerpo tal como se describe en el presente documento). La SEC ID N°: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada. La SEC ID N°: 9 corresponde a la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada. La SEC ID N°: 2 corresponde a las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera. La SEC ID N°: 10 corresponde a la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera.

Se debe entender que los ácidos nucleicos o péptidos se pueden derivar de las secuencias que se proporcionan en el presente documento. Estas secuencias se pueden clonar (por ejemplo, mediante PCR) e inserta en un vector y/o células para producir péptidos que corresponden a regiones variables de longitud completa o fragmentos de regiones variables de longitud completa, y anticuerpos que comprenden las regiones variables. Por lo tanto, es posible generar anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una combinación de regiones variables de cadena ligera y pesada.

Las composiciones y métodos pretenden capturar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de diversos isotipos. Los anticuerpos pueden ser de un isotipo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE, IgM, IgA1, IgA2, o sIgA. Las composiciones y métodos pretenden capturar los isotipos encontrados en especies no humanas así como, pero no se limitan a, IgY en aves y tiburones. En la técnica se conocen vectores que codifican las regiones constantes de diversos isotipos y se han descrito anteriormente. (Véase, por ejemplo, Coloma *et al.* Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *J Immunol Methods*. 31 de julio de 1992; 152 (1): 89-104; Guttieri *et al.* Cassette vectors for conversion of Fab fragments into full-length human IgG1 monoclonal antibodies by expression in stably transformed insect cells. *Hybrid Hybridomics*. Junio de 2003; 22 (3): 135-45; McLean *et al.* Human and murine immunoglobulin expression vector cassettes. *Mol Immunol*. Octubre de 2000; 37 (14): 837-45; Walls *et al.* Vectors for the expression of PCR-amplified immunoglobulin variable domains with human constant regions. *Nucleic Acids Res*. 25 de junio de 1993; 21 (12): 2921-9; Norderhaug *et al.* Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells. *J Immunol Methods*. 12 de mayo de 1997 204 (1): 77-87).

Los péptidos son péptidos aislados. Como se usa en el presente documento, la expresión "péptidos aislados" se refiera que los péptidos son básicamente puros y están básicamente libres de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza o en sistemas *in vivo* hasta un punto práctico y apropiado para su uso pretendido. En particular, los péptidos son lo suficientemente puros y están lo suficientemente libres de otros componentes biológicos de sus células hospedadoras con el fin de que sean útiles, por ejemplo, en la producción de preparaciones farmacéuticas o para secuenciación. Fundado que un péptido aislado se puede mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el péptido puede comprender solamente un pequeño porcentaje en peso de la preparación. Sin embargo, el péptido es básicamente puro porque se ha separado básicamente de las sustancias con las que puede estar asociado en sistemas vivos.

Los péptidos se unen a ABCB5, preferentemente de una manera selectiva. Como se usa en el presente documento, las expresiones "unión selectiva" y "unión específica" se usan indistintamente para hacer referencia a la capacidad del péptido para unirse con mayor afinidad a ABCB5 y fragmentos del mismo que a compuestos no derivados de ABCB5. Es decir, los péptidos que se unen de forma selectiva a ABCB5 no se unirán a compuestos no derivados de ABCB5 hasta el mismo punto y con la misma afinidad con la que se unen a ABCB5 y a fragmentos del mismo, con la excepción de antígenos de reacción cruzada o moléculas preparadas para que sean miméticos de ABCB5 tales como miméticos peptídicos de carbohidratos o regiones variables de anticuerpos anti-idiotipo que se unen a los péptidos de unión a ABCB5 de la misma manera que ABCB5. En algunas realizaciones, el péptido se une únicamente a ABCB5 y fragmentos del mismo. Como se usa en el presente documento, un péptido de unión que se une de forma selectiva o específica a células tumorales ABCB5 también se puede unir a ABCB5 a partir de otras

fuentes y se unirá con menor afinidad (en su caso) a compuestos no derivados de ABCB5. La afinidad menor puede incluir menor en menos de un 10 %, menos de un 20 %, menos de un 30 %, menos de un 40 %, menos de un 50 %, menos de un 60 %, menos de un 70 %, menos de un 80 %, menos de un 90 %, o menos de un 95 %.

5 Como se usa en el presente documento, "anticuerpos aislados" se refieren a anticuerpos que están básicamente separados de forma física de otro material celular (por ejemplo, separados de células que producen los anticuerpos) o de otro material que dificulta su uso ya sea en los métodos de diagnóstico o terapéuticos que se describen en el presente documento. Preferentemente, los anticuerpos aislados están presentes en una población homogénea de anticuerpos (por ejemplo, una población de anticuerpos monoclonales). Sin embargo, algunas composiciones de anticuerpos aislados se pueden combinar con otros componentes tales como, pero que no se limitan a, vehículos, adyuvantes, y similares farmacéuticamente aceptables.

15 Las "células que producen anticuerpo aislado" que incluyen hibridomas aislados y células recombinantes aisladas (tales como las que se describen en el presente documento), como se usa en el presente documento, se refieren a células que producen anticuerpos que están básicamente separados de forma física de otras células, otro material corporal (por ejemplo, tejido y fluido ascítico), y otro material que dificulta su uso en la producción, por ejemplo, de una población aislada y preferentemente homogénea de anticuerpos.

20 Por lo tanto, en una realización, el péptido es un anticuerpo monoclonal soluble intacto aislado específico para ABCB5. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de inmunoglobulinas que se une de forma específica a un epítipo idéntico (es decir, determinante antigénico). Por ejemplo, en una realización, el péptido es un anticuerpo monoclonal que tiene una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. Están incluidos los anticuerpos monoclonales que tienen cualquier combinación de regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada.

30 Se describen anticuerpos distintos de, por ejemplo, las secuencias de 3C2-1D12, con la condición de que tales anticuerpos tengan las características de unión de los anticuerpos monoclonales que se describen en el presente documento. Opcionalmente, estos anticuerpos adicionales también aumenta la eliminación del tumor de células cancerígenas que expresan ABCB5. Un experto habitual en la materia por identificar fácilmente anticuerpos que tienen las características funcionales de este anticuerpo monoclonal usando los ensayos de identificación sistemática y de unión que se establecen con detalle en el presente documento.

35 A menos que se indique de otro modo, la expresión "anticuerpo monoclonal 3C2-1D12" o "mAb3C2-1D12" se refiere a un anticuerpo que tiene restos de unión a antígeno de, o derivados del, anticuerpo 3C2-1D12 murino.

40 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose frente a un solo sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones convencionales de anticuerpo (policlonal) que por lo general incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo del hibridoma, sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como siendo obtenidos a partir de una población básicamente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que se necesita la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular.

50 Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de la población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se producen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos separados.

55 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el método del hibridoma que se describió primero en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (documento de Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

60 En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza tal como se a descrito anteriormente en el presente documento para obtener linfocitos que produce no son capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma cells usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

65 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento por la supervivencia de las células de mieloma precursoras, sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima

hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas por lo general incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan en el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

5 Las células de mieloma preferentes son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan una producción de anticuerpos de alto nivel estable mediante las células seleccionadas que producen anticuerpos, y son sensibles a un medio, tal como, el medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferentes son líneas de mieloma murino, tales como las obtenidas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell
10 Cultivos Tipo, Rockville, Md. USA. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); y Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

15 El medio de cultivo en el que se están cultivando las células de hibridoma se somete a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos mediante células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA).

20 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad
25 deseada, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden cultivar mediante métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Algunos medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

30 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suelo mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía por afinidad.

El ADN que codifican los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos
35 convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse de forma específica a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadas recombinantes.
40 Algunos artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992).

En una realización más, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de
45 bibliotecas de fagos de anticuerpo generadas usando las técnicas que se describen en McCafferty *et al.*, Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante redistribución de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como una infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc.
50 Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Por lo general, tales polipéptidos que no son inmunoglobulina están sustituidos por los dominios constantes de un
55 anticuerpo, o están sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación con el antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

60 En otras realizaciones, el péptido es un fragmento de anticuerpo. Como se conoce bien en la técnica, solamente una parte pequeña de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicado en la unión del anticuerpo en su epítipo (véase, en general, Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7ª Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford; y Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM, (eds). Immunology, Infection and Immunity (2004) 1ª Ed. de American Society for
65 Microbiology Press, Washington D.C.). Las regiones de pFc' il Fc del anticuerpo, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento y pueden mediar la unión a receptores de Fc en células fagocíticas, pero no están

implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo a partir del que se ha escindido de forma enzimática la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', denominada un fragmento F(ab')₂, mantiene ambos de los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento aislado F(ab')₂ hace referencia a un fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión al antígeno. De forma análoga, un anticuerpo a partir del que se ha distinguido de forma enzimática la región de Fc, o que se ha producido sin la región Fc, denominado un fragmento Fab, mantiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Evolucionando aún más, los fragmentos de Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unido de forma covalente y una parte de la cadena pesada del anticuerpo denominada Fd (región variable de cadena pesada). Los fragmentos de Fd son el determinante principal de la especificidad del anticuerpo (un solo fragmento de Fd puede estar asociado con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos de Fd mantienen su capacidad de unión al epítipo en el aislamiento.

Los términos Fab, Fc, pFc', F(ab')₂ y Fv se usa en con cualquiera de los significados inmunológicos convencionales [Klein, Immunology (John Wiley, Nueva York, NY, 1982); Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology (Wiley & Sons, Inc., Nueva York); Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7ª Ed., (Blackwell Scientific Publications, Oxford); y Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM, (eds). Immunology, Infection and Immunity (2004) 1ª Ed. American Society for Microbiology Press, Washington D.C.].

En otras realizaciones, las partes de Fc de los anticuerpos se pueden sustituir con el fin de producir IgM así como anticuerpos de IgG humana que portan algunas o todas las CDR de los anticuerpos monoclonales que se describen en el presente documento. De importancia en particular es la inclusión de una región CDR3 de unión a ABCB5 y, en menor medida, las otras CDR y partes de las regiones marco conservadas de los anticuerpos monoclonales que se describen en el presente documento. Tales anticuerpos humanos tendrán una utilidad clínica en particular porque reconocerán y se unirán, preferentemente de forma selectiva, a ABCB5, pero no suscitarán una respuesta inmunitaria en seres humanos contra el propio anticuerpo.

Se pretende incluir variantes funcionalmente equivalentes de los péptidos de unión a ABCB5. Una "variante funcionalmente equivalente" es un compuesto que tiene la misma función (es decir, la capacidad de unirse a ABCB5) como los péptidos. Una variante funcionalmente equivalente puede ser de naturaleza peptídica pero no se limita de este modo. Por ejemplo, puede ser un carbohidrato, un peptidomimético, etc. En realizaciones importantes, la variante funcionalmente equivalentes un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una región variable o de una CDR con sustituciones conservativas en la misma, que además es capaz de unirse a ABCB5. Un ejemplo de una variante funcionalmente equivalente de CDR3 de unión a ABCB5 de la región variable de cadena pesada (es decir, la SEC ID N°: 1) es un péptido que tiene sustituciones conservativas en la SEC ID N°: 1 que se une, preferentemente de forma específica, a ABCB5, y que opcionalmente aumenta la eliminación del tumor de células que expresan ABCB5.

La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de la secuencia nativa. Las variantes de la secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, supresiones, y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

"Homología" se define como el porcentaje de restos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de la alineación de las secuencias y que introducen huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de homología. Algunos métodos y programas informáticos para la alineación se conocen bien en la técnica.

Se contemplan modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Algunas variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución se realiza para llegar al constructo final, con la condición de que el constructo final posea las características deseadas. Las alteraciones en el aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en el que se prepara la secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferentes para mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" tal como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí, un resto o grupo de restos diana se identifican (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o con carga negativa (lo más preferentemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con antígenos. Esas ubicaciones de los aminoácidos que demuestran una sensibilidad funcional para las sustituciones se refinan a continuación mediante la introducción adicional u otras variantes, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aún que el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos se determina previamente, no es necesario determinar previamente la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una

mutación en un sitio dado, se realiza barrido de ala o mutagénesis aleatorio en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se identifican sistemáticamente para la actividad deseada.

5 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que tienen una longitud que varía de un resto polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de un solo aminoácido o de múltiples aminoácidos. Algunos ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C el anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

10 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituido con un resto diferente. Los sitios del mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR.

15 Como se usa en el presente documento, "sustitución conservativas" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera la carga relativa o características de tamaño del péptido en el que se realiza la sustitución del aminoácido. Algunas sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen instituciones realizadas entre aminoácidos con los siguientes grupos: (1) M, I, L, V; (2) F, Y, W; (3) K, R, H; (4) A, G; (5) S, T; (6) Q, N; y, (7) E, D.

20 Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se consiguen mediante la selección de sustituciones que difieren de forma significativa en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica a en la zona de la sustitución, por ejemplo, en forma de una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

25 (1) no polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
 (2) polar sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
 (3) ácido: Asp (D), Glu (E)
 30 (4) básico: Lys (K), Arg (R), His (H).

Como alternativa, los restos de origen natural se pueden dividir en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los sitios restantes (no conservados).

40 Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional habrán mejorado sus propiedades biológicas con respecto al anticuerpo precursor a partir del que se generan. Una manera conveniente para generar tales variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando presentación de fagos. En resumen, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes que presentan fagos se identifican sistemáticamente a continuación por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen de forma significativa a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a identificación sistemática tal como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para un mayor adicional.

60 Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

65 Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede

comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

5 De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo usado en los métodos que se describen en el presente documento puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo, en la región Fc, además de la mutación de la secuencia bisagra que se describen el presente documento. Sin embargo con estos anticuerpos mantendrían sustancialmente las mismas características necesarias para su utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que se pueden hacer ciertas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión a C1q y/o Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC) alteradas (es decir, mejorada o disminuido), por ejemplo, tal como se describe en el documento de patente WO99/51642. Véase también Duncan y Winter Nature 322: 738-40 (1988); documento de Patente de Estados Unidos N° 5.648.260; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y documento de patente WO94/29351 que se refieren a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

15 Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-ABCB5 también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, se pueden añadir con el acebo enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv).

25 Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alteración se hace referencia a la supresión de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo, y/o a la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo, la glicosilación de anticuerpos por lo general está unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

35 La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas que se han descrito anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se prevé realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

40 Equivalencia funcional se refiere a una actividad equivalente (por ejemplo, unión a ABCB5, o mejorar la eliminación de células que expresan ABCB5), sin embargo, también incluye la variación en el nivel de dicha actividad. Por ejemplo, un equivalente funcional es una variante que se une a ABCB5 con una afinidad menor, igual o mayor paralelos los clones de anticuerpos monoclonales que se describen en el presente documento, con la condición de que la variante todavía sea útil (es decir, se une a ABCB5 y, opcionalmente, potencia la eliminación del tumor).

45 Tales sustituciones se pueden realizar mediante una diversidad de métodos conocidos por un experto habitual en la materia. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos mediante mutación dirigida por PCR, mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con el método de Kunkel (Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82: 488-492, 1985), o mediante síntesis química de un gen que codifica la CDR en particular o un péptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la CDR que se describen en el presente documento. Los expertos habituales en la materia conocerán estos y otros métodos para efectuar la alteración de una CDR que contiene péptidos son y se pueden encontrar en referencias que recopilan tales métodos, por ejemplo, Sambrook o Ausubel, mencionados anteriormente. Sin embargo, en algunas realizaciones, debido al tamaño de las CDR, puede ser más conveniente sintetizar los péptidos variantes usando un sintetizador peptídico, tales como los que se encuentran disponibles en el comercio. La actividad de las variantes funcionalmente equivalentes de la unión CDR a ABCB5 se puede someter a ensayo mediante los ensayos de unión, y en algunos casos ensayos de actividad biológica, que se analizan con más detalle a continuación. Como se usa en el presente documento, las expresiones "variante funcional", "variante funcionalmente equivalente" y "variante funcionalmente activa" se usan indistintamente.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de anticuerpo funcionalmente activo" se refiere a un fragmento de una molécula de anticuerpo que incluye una región de unión a ABCB5 que mantiene la capacidad de unirse a ABCB5 respectivamente, preferentemente de una forma específica. Tales fragmentos se pueden usar tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, los fragmentos de anticuerpo funcionalmente activos bien conocidos incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd de anticuerpos. Estos fragmentos que carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, pueden tener menos unión al tejido no específica que la de un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)). Como otro

ejemplo, se pueden preparar anticuerpos de una sola cadena de acuerdo con los métodos que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778 de Ladner *et al.* Tales anticuerpos de una sola cadena incluyen las regiones variables de las cadenas ligera y pesada unidas mediante un resto conector flexible. También se ha informado de algunos métodos para obtener un anticuerpo de un solo dominio ("Fd") que comprende un dominio de una sola cadena pesada variable aislado (véase, por ejemplo, Ward *et al.*, Nature 341: 644-646 (1989), que desvela un método de identificación sistemática para identificar una región variable de cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de un solo dominio V_H) con una afinidad suficiente para su epítipo diana para unirse al mismo en forma aislada). En la técnica se conocen algunos métodos para preparar fragmentos de Fv recombinantes basados en secuencias conocidas de región variable de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo y se han descrito, por ejemplo, en Moore *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 4.462.334. Otras referencias que describen el uso y la generación de fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab (Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985)), fragmentos Fv (Hochman *et al.*, Biochemistry 12: 1130 (1973); Sharon *et al.*, Biochemistry 15: 1591 (1976); Ehrlich *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 4.355.023) y partes de moléculas de anticuerpo (Audilore-Hargreaves, documento de Patente de Estados Unidos N° 4.470.925). Por lo tanto, los expertos en la materia pueden preparar fragmentos de anticuerpo a partir de diversas partes de anticuerpos intactos sin destruir la especificidad de los anticuerpos hacia ABCB5.

En divulgaciones importantes en el presente documento, el fragmento de anticuerpo funcionalmente activo también mantiene la capacidad para aumentar la eliminación de células que expresan ABCB5. En este último caso, el fragmento de anticuerpo incluye una región Fc así como un dominio de unión al epítipo. La región Fc permite que el fragmento de anticuerpo se una a células positivas para el receptor Fc, que posteriormente fagocita al epítipo unido mediante la región de Fab del anticuerpo.

Los péptidos anti-ABCB5 pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tal como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los restos de una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos con restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen con restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias de marco conservadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá básicamente todos de al menos uno, y por lo general todos, dominios variables, en los que todas o básicamente todas las regiones de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o básicamente todas las regiones de FR sondas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biot, 2: 593-596 (1992)].

En la técnica se conocen bien algunos métodos para la humanización de anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de "importación", que por lo general se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar básicamente después del método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de las CDR o secuencias de CDR de roedor para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (documento de Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que básicamente en menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados por lo general son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos con restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se identifica sistemáticamente frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más próxima a la del roedor se acepta a continuación como la región de marco conservada humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chotia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método usa una región de marco conservada en particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligera o pesada. La misma región de marco conservada se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferente, se los anticuerpos humanizados se preparan mediante un método de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursora y humanizada. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales normalmente están disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras de conformación tridimensional de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor e importa secuencias de modo que se consigue la característica del anticuerpo deseada, tal como un aumento de la afinidad hacia el antígeno o antígenos indiana. En general, los restos de la región hipervariable están implicados directamente y de forma más sustancial en influir en la unión al antígeno.

Un anticuerpo humanizado a modo de ejemplo de interés en el presente documento comprende los restos DYYMY (SEC ID N°: 3); TINDGGTTY (SEC ID N°: 4); y/o DDYYGSHFDAMDY (SEC ID N°: 5) que determinan la complementariedad del dominio pesado variable, que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de esos restos de CDR, por ejemplo cuando las modificaciones mantienen o aumentan básicamente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR pesada variable mencionadas anteriormente. Tales variantes de anticuerpo se pueden preparar mediante maduración por afinidad.

El anticuerpo humanizado puede comprender los restos RASKSVSTSGYSYMH (SEC ID N°: 6); LVSNLES (SEC ID N°: 7); y/o QHIRELTR (SEC ID N°: 8) que determinan la complementariedad del dominio ligero variable, por ejemplo además de los restos de CDR de dominio pesado variable en el párrafo precedente. Tales anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los restos de CDR mencionados anteriormente, por ejemplo en las que las modificaciones mantienen o aumentan básicamente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR ligera variable mencionadas anteriormente.

La presente solicitud también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se unen a ABCB5. El anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias ligera y/o pesada variables de las SEC ID N°s: 2 y 1, respectivamente. El anticuerpo madurado por afinidad se une preferentemente a ABCB5 con una afinidad superior a la del mAb3C2-1D12 murino.

Se contemplan las formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o madurado por afinidad anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

El documento de Solicitud de Patente Europea 0239400 proporciona una enseñanza a modo de ejemplo de la producción y uso de anticuerpos monoclonales humanizados en los que al menos la parte de CDR de un anticuerpo murino (u otro mamífero no humano) está incluido en el anticuerpo humanizado. En resumen, los siguientes métodos son útiles para la preparación de un anticuerpo monoclonal de CDR humanizado que incluye al menos una parte de una CDR de ratón. Se prepara un primer vector de expresión replicable que incluye un promotor adecuado unido de forma operativa a una secuencia de ADN que codifica al menos un dominio variable de una cadena pesada o ligera de Ig y el dominio variable comprende regiones marco conservadas de un anticuerpo humano y una región CDR de un anticuerpo murino. Opcionalmente se prepara un segundo vector de expresión replicable que incluye un promotor adecuado unido de forma operativa a una secuencia que codifica ADN, al menos el dominio variable de una cadena ligera o pesada de Ig humana complementaria respectivamente. A continuación, una línea celular se transforma con los vectores. Preferentemente, la línea celular es una línea celular de mamífero inmortalizada de origen linfóide, tal como una línea celular de mieloma, hibridoma, trioma, o cuadroma, o es una celular linfóide normal que se ha inmortalizado mediante transformación con un virus. La línea celular transformada se cultiva a continuación en condiciones conocidas por los expertos en la materia para producir el anticuerpo humanizado.

Tal como se ha expuesto en el documento de Solicitud de Patente Europea 0239400, en la técnica se conocen bien varias técnicas para crear dominios de anticuerpo en particular para su inserción en el vector replicable. (Algunos vectores y técnicas recombinantes preferentes se analizan con mayor detalle a continuación.) Por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el dominio se puede preparar mediante síntesis de oligonucleótidos. Como alternativa, un gen sintético que carece de las regiones CDR en las que cuatro regiones demarco conservadas se fusionan en conjunto con sitios de restricción adecuados en las uniones, de modo que algunos casetes de CDR subclonado sintético bicatenario o restringido se podrían ligar con extremos cohesivos se podrían ligar en las uniones de las regiones demarco conservadas. Otro método implica la preparación de la secuencia de ADN que

codifica el dominio que contiene la CDR variable mediante mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótido. Cada uno de estos métodos se conoce bien en la técnica. Por lo tanto, los expertos en la materia pueden preparar anticuerpos humanizados que contienen una región CDR murina sin destruir la especificidad del anticuerpo hacia su epítipo.

- 5 Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de la región de unión de cadena pesada a anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una inhibición completa de producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); y los documentos de Patente de Estados Unidos N° 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.
- 10
- 15
- 20 Como alternativa, se puede usar tecnología de presentación de fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, algunos genes de dominio V de anticuerpo se clonan en marco ya sea en un gen de proteína de cubierta principal o secundaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación del fago se puede realizar en una diversidad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S, y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Para presentación de fagos se pueden usar varias fuentes de segmentos del gen V. Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria del gen V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos de una matriz diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) básicamente siguiendo las técnicas que se describen en Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véanse también, los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 5.565.332 y 5.573.905. También se pueden generar anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 5.567.610 y 5.229.275).
- 25
- 30
- 35
- 40 Algunos anticuerpos monoclonales también se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como los que se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.567.610, expedido por Borrebaeck *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 565. 354, expedido por Ostberg, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.571.893, expedido por Baker *et al.*, Kozber, J. Immunol. 133: 3001 (1984), Brodeur, *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, Nueva York, 1987), y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147: 86-95 (1991).
- 45

También se sedes de la el uso de fragmentos de región variable de cadena sencilla (scFv). Los fragmentos de la región variable de cadena sencilla se realizan mediante la unión de las regiones de cadena ligera y/o pesada usando un péptido de enlace corto. Como conector en un scFv se puede usar cualquier péptido que tenga flexibilidad y longitud suficiente. Por lo general, se selecciona el enlazador que tiene poca o ninguna inmunogenicidad. Un ejemplo de un péptido de unión son múltiples restos de GGGGS, que unen por puente el extremo carboxi de una región variable y el extremo amino terminal de otra región variable. También se pueden usar otras secuencias de unión.

50

- 55 Toda o cualquier parte de la cadena pesada o ligera se puede usar en cualquier combinación. Por lo general, la totalidad de las regiones variables están incluidos en el scFv. Por ejemplo, la región variable de cadena ligera se puede unir a la región variable de la cadena pesada. Como alternativa, una porción de la región variable de cadena ligera se puede unir a la región variable de cadena pesada, o parte de la misma. También se contemplan los scFv en los que la región variable de cadena pesada es del anticuerpo de interés, y la región variable de cadena ligera es de otra inmunoglobulina.
- 60

Los scFv se pueden ensamblar en cualquier orden, por ejemplo, V_H-conector-V_L o V_L-conector-V_H. Puede haber una diferencia en el nivel de expresión de estas dos configuraciones en sistemas de expresión en particular, en cuyo caso una de estas formas puede ser preferente. También se pueden preparar scFv en tándem, tales como, (X)-conector-(X)-conector-(X), en los que X son polipéptidos de los anticuerpos de interés, o combinaciones de estos polipéptidos con otros polipéptidos. En otra realización, los polipéptidos de anticuerpos de una sola cadena no tienen

65

polipéptido conector, o solamente un conector corto, inflexible. Algunas configuraciones posibles son $V_L - V_H$ y $V_H - V_L$. La unión es demasiado corta para permitir la interacción entre V_L y V_H dentro de la cadena, y las cadenas forman homodímeros con un sitio de unión al antígeno V_L / V_H en cada extremo. En la técnica tales moléculas se denominan "diacuerpos".

5 Se pueden producir regiones variables de una sola cadena ya sea de manera recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, se puede usar un sintetizador automático. Para la producción recombinante de scFv, un plásmido adecuado que contiene polinucleótido que codifica el scFv se puede introducir en una célula hospedadora adecuada, ya sea eucariota, tal como células de levadura, planta, insecto o mamífero, o procariota, tal como *E. coli*, y la proteína expresadas en puede aislar usando técnicas de purificación de proteínas convencionales.

15 Las condiciones de expresión deberían ser tales que el polipéptido scFv puede asumir una estructura terciaria óptima. Dependiendo del plásmido usado y la célula hospedadora, puede ser necesario modular la tasa de producción. Por ejemplo, el uso de un promotor más débil, o expresión a temperaturas más bajas, puede ser necesario para optimizar la producción de scFv plegado de forma correcta en sistemas procariotas; o puede ser preferentemente para expresar scFv en células eucariotas.

20 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptidos (V_H-V_L). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento de patente EP 404.097; documento de patente WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

25 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento fluyen de forma específica anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada.

35 Algunos anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el ABCB5, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína de superficie celular o receptor o subunidad del receptor. En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de inmunoglobulina de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades [Milstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la selección aleatoria de cadenas pesadas y ligeras inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se consigue normalmente mediante etapas de cromatografía por afinidad. Algunos procedimientos similares se desvelan en el documento de patente WO 93/08829, publicado el 13 mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

45 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpo trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60 (1991).

50 Además algunos péptidos pequeños que incluyen los que contienen la región CDR3 de unión a ABCB5 se pueden sintetizar o producir fácilmente por medios recombinantes para producir el péptido. Tales métodos son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Los péptidos se pueden sintetizar, por ejemplo, usando sintetizadores peptídicos automáticos disponibles en el comercio. Los péptidos se pueden producir con técnicas recombinantes mediante la incorporación del ADN que expresa el péptido en un vector de expresión y pero las transformante es con la el vector de expresión para producir el péptido.

55 Los péptidos, incluyendo anticuerpos, se pueden someter a ensayo por su capacidad para unirse a ABCB5 usando ensayos de unión convencionales conocidos en la técnica. Como las de un ensayo adecuado, ABCB5 se puede inmovilizar sobre una superficie (tal como en un pocillo de una placa de múltiples pocillos) y a continuación poner en contacto con un péptido marcado. La cantidad de péptido que se une al ABCB5 (y por lo tanto se llega a autoinmovilizar sobre la superficie) se puede cuantificar a continuación para determinar si un péptido en particular se une a ABCB5. Como alternativa, la cantidad de péptido no unido a la superficie también se puede medir. En una variación de este ensayo, el péptido se puede someter a ensayo por su capacidad para unirse directamente a una célula que expresa ABCB5.

65 El péptido de unión también se puede someter a ensayo usando un ensayo de competición. Si el péptido que se está sometiendo a ensayo (incluyendo un anticuerpo) compite con los anticuerpos monoclonales o fragmentos de

anticuerpos que se describen en el presente documento, como se muestra mediante una disminución en la unión del anticuerpo o fragmento monoclonal, entonces es probable que el péptido y el anticuerpo monoclonal se unan con el mismo epítipo, o al menos uno de superposición. En este sistema de ensayo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está marcado y el ABCB5 se inmoviliza sobre la superficie sólida. De esta manera, se pueden identificar péptidos que compiten incluyen anticuerpos que compiten. Se describen péptidos y anticuerpos en particular (y fragmentos de los mismos) que compiten con el anticuerpo 3C2 1D12 por la unión a ABCB5 (es decir, los anticuerpos que reconocen y se unen a los mismos epítipos que 3C2 1D12).

También se desvelan moléculas pequeñas que se unen a ABCB5 y mejoran la eliminación del tumor. Tales moléculas de unión se pueden identificar mediante los métodos convencionales de identificación sistemática, tales como procedimientos de presentación de fagos (por ejemplo, métodos que se describen en Hart *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 12468 (1994)). Hart *et al.* informan de una biblioteca de presentación en fago filamentoso para la identificación de nuevos ligandos peptídicos. En general, las bibliotecas de presentación de fagos que usan, por ejemplo, fago M13 o fd, se preparan usando procedimientos convencionales tales como los que se han descrito en la referencia mencionada anteriormente. Las bibliotecas generalmente presentan insertos que contienen de 4 a 80 restos de aminoácidos. Los insertos representan opcionalmente una matriz de péptidos completamente degenerada o sesgada. Se obtienen ligandos que tienen las propiedades de unión adecuadas mediante la selección de los fagos que expresan en su superficie un ligando que se une a la molécula diana. Estos fagos se someten después a varios ciclos de reselectión para identificar los fagos que expresan el ligando peptídico que tienen las características de unión más útiles. Por lo general, los fagos que presentan las mejores características de unión (por ejemplo, afinidad más elevada) se caracterizan adicionalmente mediante análisis de ácido nucleico para identificar las secuencias de aminoácidos en particular del péptido expresado en la superficie del fago en la longitud óptima del péptido expresado para conseguir la unión óptima. En Brissette R *et al.*, Curr Opin Drug Discov Devel. Mayor de 2006; 9 (3): 363-9 también se describe biblioteca de péptido o anticuerpo de presentación de fago.

Como alternativa, se pueden identificar moléculas de unión a partir de bibliotecas combinatorias. Se han descrito muchos tipos de bibliotecas combinatorias. Por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N° 5.712.171 (que describe métodos para preparar matrices de constructos moleculares sintéticos mediante la formación de una pluralidad de constructos moleculares que tienen una estructura principal de armazón de la molécula química y la modificación de al menos una ubicación en la molécula en una matriz ordenada de forma lógica); N° 5.962.412 (que describe métodos para preparar polímeros que tienen propiedades fisicoquímicas específicas); y N° 5.962.736 (que describe compuestos en matrices específicas).

Los expertos en la materia pueden identificar otras moléculas de unión siguiendo las directrices que se describen en el presente documento. Se puede usar tecnología de biblioteca para identificar moléculas pequeñas, que incluyen péptidos pequeños, que se unen a ABCB5 e interrumpen su función. Una ventaja del uso de bibliotecas a la identificación de antagonistas es la fácil manipulación de millones de diferentes supuestos candidatos de tamaños pequeños en volúmenes de reacción pequeños (es decir, en reacciones de síntesis y de identificación sistemática). Otra ventaja de las bibliotecas la capacidad para sintetizar antagonistas que de otro modo no se podrían conseguir usando fuentes de origen natural, en particular en el caso de restos no peptídicos.

Las bibliotecas de moléculas pequeñas se pueden identificar sistemáticamente por sus efectos moduladores en el transporte de flujo de rodamina-123 mediado por ABCB5, a partir del que se puede deducir la unión a ABCB5. También se pueden identificar sustratos o inhibidores potenciales de la función de ABCB5 mediante correlación de genes o expresión de proteínas de ABCB5 a través del panel NCI-60 de líneas celulares de cáncer del Instituto Nacional del Cáncer con potencias farmacológicas establecidas de > 100.000 compuestos para estas líneas celulares, del mismo modo en que se describe en Frank *et al.* Cancer Research 2005 para una selección de 119 agentes anticancerosos convencionales.

Muchos, si no todos estos compuestos se pueden sintetizar usando bibliotecas recombinantes o químicas. Se puede generar una amplia matriz de compuestos candidatos a partir de bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Algunas bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se pueden producir fácilmente. Las bibliotecas naturales y producidas de forma sintética y algunos compuestos se pueden modificar fácilmente a través de medios químicos, físicos, y bioquímicos convencionales. Además, algunos compuestos de los que se sabe que se unen y por lo tanto actúan como antagonistas de canales de calcio se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc. para producir análogos estructurales que pueden funcionar del mismo modo quizá con mayor especificidad.

También se pueden generar bibliotecas combinatorias de molécula pequeña. Una biblioteca combinatoria de compuestos orgánicos pequeños es una colección de análogos muy relacionados que difieren entre sí en uno o más puntos de diversidad y se sintetizan mediante técnicas orgánicas usando procesos de múltiples etapas. Las bibliotecas combinatorias incluyen un gran número de compuestos orgánicos pequeños. Un tipo de biblioteca combinatoria se prepara por medio de métodos de síntesis en paralelo para producir una matriz de compuesto. Una "matriz de compuesto" tal como se usa en el presente documento es una colección de compuestos que se pueden identificar mediante sus direcciones espaciales en coordenadas Cartesianas y se pueden colocar de modo que cada

compuesto tiene un núcleo molecular común y uno o más elementos de diversidad estructural variable. Los compuestos en tal matriz de compuesto se producen en paralelo en recipientes de reacción separados, con cada compuesto identificado y trazado mediante su dirección espacial. Algunos ejemplos de mezclas de síntesis en paralelo y métodos de síntesis en paralelo se proporcionan en la solicitud de patente publicada de PCT WO95/18972, publicada el 13 de julio de 1995 y el documento de la Patente de Estados Unidos N° 5.712.171 concedida al 27 de enero de 1998 y su correspondiente solicitud de patente de PCT publicada WO96/22529.

En la técnica se conocen bien algunos ensayos de unión convencionales, y un número de éstos son adecuados incluyendo ELISA, ensayos de unión por competición (como se ha descrito anteriormente), ensayos de sándwich, ensayos de radiorreceptor usando péptidos marcados de forma radiactiva o anticuerpos radiomarcados, inmunoensayos, etc. La naturaleza del ensayo no es esencial siempre que sea lo suficientemente sensible para detectar la unión de un número pequeño de péptidos.

Una diversidad de otros reactivos también se puede incluir en la mezcla de unión. Estos incluyen reactivos tales como sales, tampones, proteínas neutras (por ejemplo, albúmina), detergentes, etc., que se pueden usar para facilitar la unión óptima. Un reactivo de este tipo también puede reducir las interacciones no específicas o de fondo de los componentes de reacción. También se pueden usar otros reactivos que mejoran la eficacia del ensayo. La mezcla de los materiales de ensayo anteriores se incubaba en condiciones en las que el anticuerpo monoclonal se une normalmente de forma específica a ABCB5. Tales condiciones imitarán preferentemente las condiciones fisiológicas. El orden de adición de los componentes, temperatura de incubación, tiempo de incubación, y otros parámetros del ensayo se pueden determinar fácilmente. Tal experimentación simplemente implica la optimización de los parámetros del ensayo, no la composición fundamental del ensayo. Las temperaturas de incubación por lo general se encuentran entre 4 °C y 40 °C. Los tiempos de incubación se minimizan preferentemente para facilitar la identificación sistemática de alto rendimiento, y por lo general son entre 0,1 y 10 horas. Después de la incubación, la presencia o ausencia de unión específica entre el péptido y ABCB5 se detecta mediante cualquier método conveniente disponible para el usuario.

Por lo general, una pluralidad de mezclas de ensayo se ejecuta en paralelo con diferentes péptidos o diferentes concentraciones de péptido para obtener una respuesta diferente a las diversas concentraciones. Una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a concentración cero de ABCB5 o a una concentración de ABCB5 por debajo de los límites de detección del ensayo.

A menudo se usa una etapa de separación para separar el péptido o anticuerpo unido o no unido. La etapa de separación se puede conseguir en una diversidad de maneras. De forma conveniente, al menos uno de los componentes (por ejemplo, péptido o anticuerpo) se inmoviliza sobre un sustrato sólido a través de la unión a ABCB5. Los componentes no unidos se pueden separar fácilmente de la fracción unida. El sustrato sólido puede estar formado por una amplia diversidad de materiales y en una amplia variedad de formas, por ejemplo, columnas o geles de poliacrilamida, agarosa o Sepharose, placas de microtitulación, microperlas, partículas de resina, etc. La etapa de separación incluye preferentemente múltiples aclarados o lavados. Por ejemplo, cuando el sustrato sólido es una placa de microtitulación, los pocillos se pueden lavar varias veces con una solución de lavado, que por lo general incluye los componentes de la mezcla de incubación que no participan en enlaces específicos, tales como sales, tampón, detergente, proteína no específica, etc. Cuando el sustrato sólido es una perla magnética, las perlas se pueden lavar una o más veces con una solución de lavado y se pueden aislar usando un imán.

Las moléculas que se describen en el presente documento se pueden usar solas o en conjugados con otras moléculas tales como detección o agentes citotóxicos en los métodos de detección y tratamiento que se describen en el presente documento, tal como se describe con más detalle en el presente documento.

Por lo general, uno de los componentes comprende normalmente, o se acopla o se conjuga con una marca detectable. Un marcador detectable es un resto, cuya presencia se puede determinar directa o indirectamente. Generalmente, la detección de la marca implica una emisión de energía por la marca. La marca se puede detectar directamente por su capacidad para emitir y/o absorber fotones u otras partículas atómicas de una longitud de onda en particular (por ejemplo, radiactividad, luminiscencia, densidad óptica o electrónica, etc.). Una marca se puede detectar indirectamente por su capacidad para unirse, reclutar y, en algunos casos, escindir otro resto que por sí mismo puede emitir o absorber luz de una longitud de onda en particular (por ejemplo, marca de epítipo tal como el epítipo FLAG, marca enzimática tal como peroxidasa de rábano picante, etc.). Un ejemplo de detección indirecta es el uso de una primera marca que escinde un sustrato en productos visibles. La marca puede ser de una naturaleza química, péptido o molécula de ácido nucleico, aunque no se limita de este modo. Otros marcadores detectables incluyen isótopos radiactivos tales como P^{32} o H^3 , marcadores luminiscentes tales como fluorocromos, marcadores de densidad óptica o electrónica, etc., o marcas de epítipo tales como el epítipo FLAG o el epítipo HA, biotina, avidina, y las marcas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, etc. La marca se puede unir a un péptido durante o después de su síntesis. Existen muchas marcas y métodos de marcado diferentes conocidos por los expertos habituales en la materia. Algunos ejemplos de los tipos de marcas que se pueden usar incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos habituales en la materia conocerán otras marcas adecuadas para los péptidos que se describen en el presente documento, o serán capaces de determinarlas, usando experimentación

de rutina. Además, el acoplamiento o conjugación de estas marcas a los péptidos se puede realizar usando técnicas convencionales comunes para los expertos habituales en la materia.

5 Otra técnica de marcado que puede dar como resultado una mayor sensibilidad consiste en el acoplamiento de las moléculas que se describen en el presente documento a haptenos de bajo peso molecular. A continuación, estos haptenos se pueden alterar específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es habitual el uso de haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos.

10 La conjugación de los péptidos que incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos con una marca detectable facilita, entre otras cosas, el uso de tales agentes en ensayos de diagnóstico. Otra categoría de marcas detectables incluye marcas de diagnóstico y de formación de imágenes (denominadas por lo general marcas detectables *in vivo*) tal como por ejemplo formación de imágenes por resonancia magnética (MRI): Gd(DOTA); para medicina nuclear: ²⁰¹Tl, radionúclido ^{99m}Tc de emisión gamma; para tomografía de emisión de positrones (PET): isótopos que emiten positrones, (18)F-fluorodesoxiglucosa ((18)FDG), (18)F-fluoruro, cobre-64, gadodiamida, y radioisótopos de Pb (II) tales como ²⁰³Pb; 111In.

15 Las conjugaciones o modificaciones que se describen en el presente documento usan química de rutina, que la química no forma parte de la invención y su química es bien conocida por los expertos en la técnica química. El uso de grupos protectores y conectores conocidos, tales como conectores mono y heterobifuncionales están bien documentado en la bibliografía y no se repetirá aquí.

20 Como se usa en el presente documento, "conjugado" se refiere a dos entidades unidas de forma estable entre sí mediante cualquier medio fisicoquímico. Es importante que la naturaleza de la unión sea tal que no perjudique sustancialmente a la eficacia de cualquiera de estas entidades. Manteniendo estos parámetros en mente, se puede usar cualquier enlace covalente o no covalente conocido por los expertos habituales en la materia. En algunas realizaciones, se prefiere el enlace covalente. La conjugación no covalente incluye interacciones hidrófobas, interacciones iónicas, interacciones de alta afinidad tales como formación de complejos de biotina-avidina y biotina-estreptavidina y otras interacciones de afinidad. Tales medios y métodos de unión son bien conocidos por los expertos habituales en la materia.

25 Se puede usar una diversidad de métodos para detectar la marca, dependiendo de la naturaleza de la marca y otros componentes del ensayo. Por ejemplo, la marca se puede detectar mientras está unida al sustrato sólido o después de la separación del sustrato sólido. Las marcas se pueden detectar directamente a través de densidad óptica o electrónica, emisiones radiactivas, transferencias de energía no radiantes, etc. o se pueden detectar indirectamente con conjugados de anticuerpos, conjugados de estreptavidina-biotina, etc. Los métodos para detectar las etiquetas se conocen bien en la técnica.

30 Los conjugados también incluyen un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos, o una toxina de pequeña molécula), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos incluyen BCNU, estreptoizocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 que se describe en los documentos de Patente de Estados Unidos N^{os} 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (documento de Patente de Estados Unidos N^o 5.877.296). Algunas toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar en los conjugados incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

35 Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Una diversidad de isótopos radiactivos está disponible para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, ¹³¹I, ¹²⁵I, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo tc^{99m} o I¹²³, o una marca de espín para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

40 Las radio- u otras marcas se pueden incorporar en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Las marcas tales como tc.sup.99m o I.sup.123, .Re.sup.186, Re.sup.188 qui In.sup.111 se pueden unir a través de un resto de cisteína en el péptido. El Itrio-90 se puede unir mediante un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 se puede usar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos con detalle.

Algunos conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se pueden preparar usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal es como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobeneno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminpentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento de patente WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector inestable a ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); documento de Patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

Se han determinado las secuencias responsables para la especificidad de los anticuerpos monoclonales. Por consiguiente, se pueden preparar péptidos usando tecnología del ADN recombinante. En Estados Unidos existen organismos que realizarán esta función de forma comercial, tales como la Universidad Thomas Jefferson y la Scripps Protein y Nucleic Acids Core Sequencing Facility (La Jolla, California). Por ejemplo, el ADNc de región variable se puede preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores degenerados o no degenerados (derivados de la secuencia de aminoácidos). El ADNc se puede subclonar para producir cantidades suficientes de ADN bicatenario para secuenciación mediante reacciones o equipos de secuenciación convencional.

Con el conocimiento de las secuencias de ácidos nucleicos de los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-ABCB5, un experto habitual en la materia es capaz de producir ácidos nucleicos que codifican este anticuerpo o que codifican los diversos fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanizados, o polipéptidos que se han descrito anteriormente. Se contempla que tales ácidos nucleicos se unirán de forma operativa a otros ácidos nucleicos que forman un vector recombinante para la clonación o para la expresión de los péptidos. La presente divulgación incluye cualquier vector recombinante que contiene las secuencias de codificación, o parte de las mismas, ya sea para transformación procariota o eucariota, transfección o terapia genética. Tales vectores se pueden preparar usando técnicas convencionales de biología molecular, conocidas por los expertos en la materia, y podrían comprender secuencias de codificación de ADN para la región CDR (y preferentemente la región CDR3) y secuencias variables adicionales que contribuyen a la especificidad de los anticuerpos o partes de los mismos, así como otras secuencias de péptidos no específicas y un promotor adecuado, ya sea con (Whittle *et al.*, Protein Eng. 1:499, 1987 y Burton *et al.*, Science 266: 1024-1027, 1994) o sin (Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90: 7889, 1993 y Duan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 91: 5075-5079, 1994) una secuencia señal para exportación o secreción. Tales vectores se pueden transformar o transfectar en células procariotas (Huse *et al.*, Science 246: 1275, 1989, Ward *et al.*, Nature 341: 644-646, 1989; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581, 1991 y Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7978, 1991) o eucariotas (Whittle *et al.*, 1987 y Burton *et al.*, 1994) o se pueden usar para terapia genética (Marasco *et al.*, 1993 y Duan *et al.*, 1994) mediante técnicas convencionales, conocidas por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, un "vector" puede ser cualquiera de una serie de ácidos nucleicos en los que se puede insertar una secuencia deseada mediante restricción y la ligación para transporte entre diferentes entornos genéticos o para expresión en una célula hospedadora. Por lo general, los vectores están formados por ADN aunque también están disponibles algunos vectores de ARN. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula hospedadora, y que se caracteriza adicionalmente por uno o más sitios de restricción de endonucleasa en los que el vector se puede cortar de una manera determinable y en los que una secuencia de ADN deseada se puede ligar de modo que el nuevo vector recombinante mantiene su capacidad para replicarse en la célula hospedadora. En el caso de plásmidos, la replicación de la secuencia deseada se puede producir muchas veces a medida que aumenta el número de copias del plásmido dentro de la bacteria hospedadora o simplemente una sola vez por hospedador antes de que el hospedador se reproduzca por mitosis. En el caso de fagos, la replicación se puede producir de forma activa durante una fase lítica o de forma pasiva durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es uno en el que una secuencia de ADN deseada se puede insertar mediante restricción y ligación de un modo tal que se une de forma operativa a secuencias reguladoras y se puede expresar como un transcrito de ARN. Los vectores pueden contener adicionalmente una o más secuencias marcadoras adecuadas para su uso en la identificación de células que se han transformado, o no, o se han transfectado con el vector. Algunos marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen ya sea la resistencia o la sensibilidad a antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades se pueden detectar mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica (por ejemplo, β -galactosidasa o fosfatasa alcalina), y genes que influyen visiblemente en el fenotipo de células, hospedadores, colonias o placas transformadas o transfectadas. Los vectores preferentes son aquellos capaces de replicación autónoma y de expresión de los productos genéticos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los que se unen de forma operativa.

Los vectores de expresión de la presente divulgación incluyen secuencias reguladoras unidas de forma operativa a una secuencia de nucleótidos que codifican uno de los péptidos. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de nucleótidos que son necesarias para, o que conducen a, la transcripción de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido deseado y/o que son necesarias para o que conducen a la traducción del transcrito resultante en el polipéptido deseado. Algunas secuencias reguladoras incluyen, pero no se limitan a, secuencias en la posición 5' tales como operadores, promotores y secuencias de unión a ribosomas, y secuencias en la posición 3' tales como señales de poliadenilación. Los vectores pueden incluir opcionalmente secuencias directoras en la posición 5' o señal, productos de fusión que codifican secuencias en la posición 5' o 3' para ayudar en la purificación de proteínas, y diversos marcadores que ayudan en la identificación o selección de transformantes. La elección y el diseño de un vector están dentro de la habilidad y criterio de un experto habitual en la materia. La purificación posterior de los péptidos se puede conseguir mediante cualquiera de una diversidad de medios convencionales conocidos en la técnica.

Un vector preferente para la identificación sistemática de péptidos, pero no necesariamente preferente para la producción en masa de los péptidos, es una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica y es capaz de expresar un polipéptido de fusión que contiene, en la dirección del extremo amino a carboxi, (1) un dominio de señal de secreción procariota, (2) un polipéptido, y, opcionalmente, (3) un dominio de proteína de fusión. El lector incluye secuencias reguladoras de ADN para la expresión del polipéptido de fusión, preferentemente secuencias reguladoras procariotas. Tales vectores los pueden preparar las personas con experiencia en la materia y se han descrito en Smith *et al.* (Science 228: 1315-1317, 1985), Clackson *et al.* (Nature 352: 624-628, 1991); Kang *et al.* (en "Methods: A Companion to Methods in Enzymology: Vol. 2", R.A. Lerner y D.R. Burton, ed. Academic Press, NY, pp 111-118, 1991); Barbas *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7978-7982, 1991), Roberts *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 2429-2433, 1992)

Un polipéptido de fusión puede ser útil para la purificación de los péptidos. El dominio de fusión puede incluir, por ejemplo, una cola de poli-His que permite la purificación en columnas de Ni⁺ o la proteína de unión a maltosa del vector pMAL disponible en el mercado (New England BioLabs, Beverly, MA). Un dominio de fusión preferente en la actualidad, pero de ningún modo necesario, es un ancla de membrana de fago filamentoso. Este dominio es particularmente útil para la identificación sistemática de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos monoclonales pero puede ser de menor utilidad para la producción en masa de anticuerpos. El ancla de membrana de fago filamentoso es preferentemente un dominio de la proteína de revestimiento cpIII o cpVIII capaz de asociarse con la matriz de una partícula de fago filamentoso, incorporando de este modo el polipéptido de fusión en la superficie del fago, para permitir la unión de la fase sólida a antígenos o epítopos específicos y de este modo para permitir el enriquecimiento y la selección de los anticuerpos o fragmentos específicos codificados por el vector fagémido.

La señal de secreción es un dominio peptídico director de una proteína que se dirige a la membrana de proteína de la célula hospedadora, tal como la membrana periplasmática de una bacteria gram negativa. Una señal de secreción preferente para *E. coli* es una señal de secreción de pelB. Las secuencias de restos de aminoácidos predichas del dominio de señal de secreción de los dos genes pelB que producen variantes de *Erwinia carotovora* se describen en Lei, *et al.* (Nature 381: 543-546, 1988). La secuencia directora de la proteína pelB se ha usado anteriormente como una señal de secreción para proteínas de fusión (Better, *et al.*, Science 240: 1041-1043, 1988; Sastry, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86: 5728-5732, 1989; y Mullinax, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 8095-8099, 1990). Algunas secuencias de restos de aminoácidos para otros dominios de polipéptidos de señal de secreción de *E. coli* útiles se pueden encontrar en Oliver, En Neidhard, F.C. (ed.), *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1: 56-69 (1987).

Para conseguir niveles elevados de expresión genéticas en *E. coli*, es necesario usar no solamente promotores fuertes para generar grandes cantidades de ARNm, sino también sitios de unión a ribosoma para asegurar que el ARNm se traduce de forma eficaz. En *E. coli*, el sitio de unión a ribosoma incluye un codón de inicio (AUG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud situada 3-11 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio (Shine, *et al.*, Nature 254: 34, 1975). La secuencia, AGGAGGU, que se denomina la secuencia de Shine-Dalgarno (SD), es complementaria con el extremo en la posición 3' ARNr 16S de *E. coli*. La unión del ribosoma al ARNm y la secuencia en el extremo en la posición 3' del ARNm se puede ver influido por varios factores: (i) el grado de complementariedad entre la secuencia de SD y el extremo en la posición 3' del ARNr 16S; (ii) el espaciado y posiblemente la secuencia de ADN que permanece entre la secuencia de SD y el AUG (Roberts, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 760, 1979a; Roberts, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 5596, 1979b; Guarente, *et al.*, Science 209: 1428, 1980; y Guarente, *et al.*, Cell 20: 543, 1980). La optimización se consigue midiendo el nivel de expresión de los genes en plásmidos en los que esté espaciado está alterado de forma sistemática. La comparación de los diferentes ARNm muestra que existen secuencias estadísticamente precedentes de las posiciones -20 a +13 (en las que la A del AUG es la posición 0) (Gold, *et al.*, Annu. Rev. Microbiol. 35: 365, 1981). Se ha mostrado que las secuencias directoras influyen en la traducción drásticamente (Roberts, *et al.*, 1979a, b mencionado anteriormente); y (iii) la secuencia de nucleótidos que sigue al AUG, que fluye en la unión al ribosoma (Taniguchi, *et al.*, J. Mol. Biol., 118: 533, 1978).

Las secuencias reguladoras en la posición 3' definen al menos un codón de terminación (parada) en marco con y unido de forma operativa al polipéptido de fusión heterólogo.

5 En un hospedador de expresión procariota, el vector usado incluye un origen de replicación procariota o replicón, es decir, una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante de forma extracromosómica en una célula hospedadora procariota, tal como una célula hospedadora bacteriana, transformada a partir del mismo. Tales orígenes de replicación se conocen bien en la técnica. Algunos orígenes de replicación preferentes son los que son eficaces en el organismo hospedador. Una célula hospedadora procariota, por ejemplo, es *E. coli*. Para el uso de un vector en *E. coli*, un origen de replicación preferente es ColE1 que se encuentra en pBR322 y una diversidad de otros plásmidos comunes. También es preferente el origen de replicación p15A encontrado en pACYC y sus derivados. Los replicones ColE1 y p15A usados ampliamente en biología molecular, están disponibles en una diversidad de plásmidos y se describen en Sambrook. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

15 Además, las realizaciones que incluyen un replicón procariota también incluyen preferentemente un gen cuya expresión confiere una ventaja selectiva, tal como resistencia a fármacos, con respecto a un hospedador bacteriano transformado con el mismo. Algunos genes de resistencia a fármacos bacterianos habituales son aquellos que confieren resistencia a la ampicilina, tetraciclina, neomicina/kanamicina o cloranfenicol. Por lo general, los vectores también contienen sitios de restricción convenientes para inserción de secuencias de ADN que se pueden traducir. 20 Algunos lectores a modo de ejemplo son los plásmidos pUC18 y pUC19 y vectores derivados tales como pcDNAII disponibles en Invitrogen (San Diego, CA).

25 Cuando el péptido es un anticuerpo que incluye secuencias tanto de cadena pesada como de cadena ligera, esta secuencia se puede codificar en vectores separados o, más convenientemente, se pueden expresar con un solo vector. La cadena pesada y ligera puede formar, después de la traducción o después de la secreción, la estructura heterodimérica de moléculas de anticuerpos naturales. Tal anticuerpo heterodimérico se puede estabilizar o no con enlaces disulfuro entre las cadenas pesada y ligera.

30 Un vector a la expresión de anticuerpos heterodiméricos, tal como los anticuerpos intactos o los anticuerpos de fragmento F(ab')₂, Fab o Fv, es una molécula de ADN recombinante adaptada para recibir y expresar una primera y segunda secuencias de ADN. Es decir, un vector de expresión de ADN para expresar un anticuerpo heterodimérico proporciona un sistema para clonar (insertar) de forma independiente las dos secuencias de ADN que se pueden traducir en dos casetes separados presentes el vector, para formar dos cistrones separados para expresar el primer y segundo polipéptidos de un anticuerpo heterodimérico. El vector de expresión de ADN para expresar dos cistrones se denomina vector de expresión dicistrónico. 35

Preferentemente, el vector comprende un primer casete que incluye secuencias reguladoras de ADN corriente arriba y corriente abajo unidas de forma operativa a través de una secuencia de nucleótidos adaptada para ligación direccional a un ADN inserto. La secuencia cadena arriba que se puede traducir codifica preferentemente la señal de secreción como se ha descrito anteriormente. El casete incluye secuencias reguladoras de ADN para la expresión del primer polipéptido del anticuerpo que se produce cuando una secuencia de ADN inserto que se puede traducir se inserta direccionalmente en el casete a través de la secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación direccional. 40

45 El vector de expresión dicistrónico también contiene un segundo casete para la expresión del segundo polipéptido del anticuerpo. El segundo casete incluye una segunda secuencia de ADN que se puede traducir que codifica preferentemente una señal de secreción, como se ha descrito anteriormente, única de forma operativa a su extremo en la posición 3' a través de una secuencia de nucleótidos adaptada para ligación direccional a una secuencia de ADN cadena abajo del vector que por lo general define al menos un codón de parada en el marco de lectura del casete. La segunda secuencia de ADN que se debe traducirse una de forma operativa en su extremo en la posición 50 5' secuencias reguladoras de ADN que forman los elementos en la posición 5'. El segundo casete es capaz, después de la inserción de una secuencia de ADN que se puede traducir (ADN inserto), de expresar el segundo polipéptido de fusión que comprende una señal de secreción con un polipéptido codificado por el ADN inserto.

55 Los péptidos también los pueden producir células eucariotas tales como células CHO, hibridomas humanos, células B-linfoblastoides inmortalizadas, y similares. En este caso, se construye un vector en el que las secuencias reguladoras eucariotas están unidas de forma operativa a las secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. El diseño y la selección de un vector eucariota apropiado están dentro de la habilidad y criterio de un experto habitual en la materia. La purificación posterior de los péptidos se puede conseguir mediante cualquiera de una diversidad de medios convencionales conocidos en la técnica. 60

En otra realización, se desvelan células hospedadoras, tanto procariotas como eucariotas, transformará su transfectadas con, y por lo tanto que incluyen, los vectores.

65 Algunas células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-ABCB5 glucosilado proceden de organismos pluricelulares. Algunos ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras de

insecto tolerantes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para transfección están disponibles al público, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus se pueden usar como el virus en el presente documento, en particular para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Como huéspedes también se pueden usar cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Las células de vertebrados también son de interés en particular como células hospedadas. Algunos ejemplos de líneas celulares hospedadora es de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de monos transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR(CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mamá de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación que se han descrito anteriormente para producción de anticuerpo anti-ABCB5 y se cultivan en un medio de nutrientes convencional modificado según sea apropiado para inducción de promotores, selección de transformantes, o amplificación de los genes que codifican la secuencias deseadas.

Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo anti-ABCB5 se pueden cultivar en una diversidad de medios. Los medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios que se describen en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; en el documento de patente WO 90/03430; documento de patente WO 87/00195; o Re. de Pat. de Estados Unidos N° 30.985 se pueden usar como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede complementar, si fuera necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN.TM.), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o cualquier fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario cambio se puede incluir en concentraciones apropiadas que son conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, similares, son las que se han usado anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto habitual en la materia.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir por vía intracelular, en el espacio periplasmático, o se puede secretar directamente en el medio. Sin anticuerpo se produce por vía intracelular, como una primera etapa, las partículas de residuos, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. La composición del anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía por afinidad, siendo la cromatografía por afinidad la técnica de purificación preferente. La matriz a la que se une el ligando de afinidad de forma más habitual es la agarosa, pero existe disponibilidad de otras matrices. Algunas matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con la agarosa. Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizada preferentemente a concentraciones bajas de sal (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

Como se usa en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos, el término "aislado" se refiere al: (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido de forma recombinante por clonación; (iii) purificado, tal como mediante escisión y separación en gel; o (iv) sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que se puede manipular fácilmente mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos contenida en un vector en el que se conocen sitios de restricción en las posiciones 5' y 3' o para el que se han desvelado secuencias cebadoras para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera aislada pero una secuencia de ácido sulfúrico se existe en su estado nativo en su hospedador natural no lo está. Un ácido nucleico aislado puede estar básicamente purificado, pero no es necesario que sea de este mundo. Por ejemplo, un ácido nucleico que se aísla dentro de un lector de la nación o de expresión no es puro porque puede comprender solamente un pequeño

porcentaje del material en la célula en la que reside. Sin embargo, tal ácido nucleico se aísla, tal como se usa el término en el presente documento, porque se puede manipular fácilmente mediante técnicas convencionales conocidas por las personas con experiencia habitual en la materia.

5 Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia de codificación y secuencias reguladoras están "unidas de forma operativa" cuando se unen de forma covalente de una manera tal como para colocar la expresión o transcripción de la secuencia genética bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias de codificación se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas de forma operativa si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras en la posición 5' da como resultado la transcripción de la secuencia de codificación y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación del desplazamiento del marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias de codificación, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente a traducir en una proteína. Por lo tanto, una región promotora se unía de forma operativa a una secuencia de codificación si la región promotora fuera capaz de realizar la transcripción de esa secuencia de ADN de modo que el transcrito resultante se pudiera traducir en la proteína o polipéptido deseado.

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión genética puede variar entre especies o tipos celulares, pero en general incluirán, si fuera necesario, secuencias de no transcripción en la posición 5' y secuencias de no traducción en la posición 5' implicadas con el inicio de la transcripción y la traducción respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de protección, secuencia de CAAT, y similares. Especialmente, tales secuencias reguladoras de no transcripción en la posición 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control de la transcripción del frente unido de forma operativa. Si se desea, algunas secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras cadena arriba.

Las composiciones y métodos que se describen en el presente documento se pueden potenciar mediante el uso en combinación con otros procedimientos para el cáncer y lesiones pre cancerígenas. En algunos casos, el procedimiento de tratamiento implica la administración de otro agente terapéutico tal como un agente anticáncer, que incluye, pero no se limita, agentes de quimioterapéuticos y radiación. Algunos agentes quimioterapéuticos se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, taxol, paclitaxel, cloroetilnitrosoureas que no contienen azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, Meglamina GLA, valrubicina, carmustina y poliferposán, MMI270, BAY 12-9566, inhibidor de la RAS famesil transferasa, inhibidor de la famesil transferasa, MMP, dacarbazina, LY294002, PX866, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hycamtin/Topotecán, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrona/Mitoxantrona, Metaret/Suramin, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/Valrubicina, Metastron/derivado de estroncio, Temodal/Temozolomida, Evacet/doxorubicina liposomal, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/Capecitabina, Furtulón/Doxifluridina, Ciclopax/paclitaxel oral, Taxoide Oral, SPU-077/Cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor de oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT(Tegafur/Uracilo), Ergamisol/Levamisol, Eniluracilo/776C85/potenciador de 5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/Irinotecán, Tumodex/Ralitrexed, Leustatina/Cladribina, Paxex/Paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposomal, Caelyx/doxorubicina liposomal, Fludara/Fludarabina, Pharmarrubicina/Epirrubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naftalimida, LU 103793/Dolastatina, Caetyx/doxorubicina liposomal, Gemzar/Gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de PARP, D4809/Dexifosamida, Ifes/Mesnex/Ifosamida, Vumon/Tenipósido, Paraplatino/Carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepesid/Etopósido, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, profármaco de arabinósido de guanina, Análogo de taxano, nitrosoureas, agentes de alquilación tales como melfalán y ciclofosfamida, Aminoglutetimida, Asparaginasa, Busulfán, Carboplatino, Clorombucilo, HCl de Citarabina, Dactinomifina, HCl de Daunorubicina, fosfato sódico de Estramustina, Etopósido (VP16-213), Floxuridina, Fluorouracilo (5-FU), Flutamida, Hidroxiurea (hidroxicarbamida), Ifosfamida, Interferón Alfa-2a, Alfa-2b, acetato de Leuprolida (análogo del factor de liberación de LHRH), Lomustina (CCNU), HCl de Mecloretamina (mostaza de nitrógeno), Mercaptopurina, Mesna, Mitotano), HCl de Mitoxantrona, Octreótido, Plicamicina, HCl de Procarbazona, Estreptozocina, citrato de Tamoxifeno, Tioguanina, Tiotepa, sulfato de Vinblastina, Amsacrina (m-AMSA), Azacitidina, Eritropoyetina, Hexametilmelamina (HMM), Interleuquina 2, Mitoguzona (metil-GAG; metil glioxal bis-guanilhidrazona; MGBG), Pentostatina (2'desoxicoformicina), Semustina (metil-CCNU), Tenipósido (VM-26) y sulfato de Vindesina, pero no se limita a los mismos.

Los métodos que se describen en el presente documento se pueden realizar con terapias para el tratamiento del cáncer tales como cirugía y radiación. Los métodos que se describen en el presente documento sazone se pueden realizar en combinación con un agente terapéutico que es un ARN corto aislado que dirige la degradación específica de la secuencia de un ARNm específico de cáncer a través de un proceso conocido como ARN de interferencia (ARNi). En algunas realizaciones, el ARNm específico de cáncer es ABCB5. Se sabe que el proceso se produce en una gran diversidad de organismos, que incluyen embriones de mamíferos y otros vertebrados. Se ha demostrado que el ARNs se procesa en 21-23 nucleótidos (nt) de longitud de segmentos de ARN, y además que median el ARN de interferencia en ausencia de ARNs más largo. Por lo tanto, estos fragmentos de 21-23 nt son mediadores

específicos de la secuencia de la degradación del ARN y en el presente documento se denominan ARNi o ARNi. En el presente documento se describen algunos métodos que incluyen el uso de estos fragmentos (u oligonucleótidos producidos de forma recombinante o sintetizados de forma química de la misma naturaleza o de naturaleza similar) para permitir el dirección y en todo de los ARNm específicos para el cáncer para la degradación en células de mamífero útiles en las aplicaciones terapéuticas que se analizan en el presente documento.

Los métodos para el diseño del ARN que media el ARNi y los métodos para transfección de los ARN en células y animales se conocen bien en la técnica y las moléculas de ARNi están fácilmente disponibles en el mercado (Verma N.K. *et al.*, J. Clin. Pharm. Ther., 28 (5): 395-404(2004), Mello C.C. *et al.* Nature, 431 (7006) 338-42 (2004), Dykxhoom D.M. *et al.*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (6): 457-67 (2003) Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, USA), Glen Research (Sterling, VA, USA), ChemGenes (Ashland, MA, USA), y Cruachem (Glasgow, UK)). Los ARN preferentemente se sintetizan de forma química usando fosforamiditas de ribonucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. De forma más conveniente, los ARNi se obtienen a partir de proveedores comerciales de oligo síntesis de ARN que se enumeran en el presente documento. En general, los ARN no son demasiado difíciles de sintetizar y se proporcionan fácilmente con una calidad adecuada para el ARNi. Una síntesis de ARN habitual en una escala de 0,2 μ mol proporciona aproximadamente 1 miligramo de ARN, que es suficiente para 1000 experimentos de transfección usando un formato de placa de cultivo tisular de 24 pocillos.

El ADNc específico para el cáncer y el ARNi específico se diseña preferentemente mediante la selección de una secuencia que no está dentro de 50-100 pb del codón de partida y el codón de terminación, evita las regiones de intrón, evita tramos de 4 o más bases tales como AAAAA, CCCC, evitar regiones con un contenido de GC < 30 % o >60 %, evitar repeticiones y secuencias de baja complejidad, y evita sitios de polimorfismo de un solo nucleótido. La secuencia diana puede tener un contenido de GC de aproximadamente un 50 %. La secuencia dirigida de ARNi se puede evaluar adicionalmente usando una búsqueda de homología BLAST para evitar los efectos fuera de diana en otros genes o secuencias. Algunos controles negativos se diseñan mediante codificación de secuencias de ARNi dirigido. El ARN de control tiene preferentemente la misma longitud y composición de nucleótidos que el ARNi pero tiene al menos 4-5 bases desparejadas con respecto al ARNi. Las moléculas de ARN pueden comprender un grupo hidroxilo en la posición 3'. Las moléculas de ARN pueden ser monocatenarias o bicatenarias; tales moléculas pueden tener extremo romos o pueden comprender extremos salientes (por ejemplo, 5', 3') de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nucleótidos de longitud (por ejemplo, nucleótidos de pirimidina, nucleótidos de purina). Con el fin de aumentar adicionalmente la estabilidad del ARN, los salientes en la posición 3' se pueden estabilizar frente a la degradación. El ARN se puede estabilizar incluyendo nucleótidos purínicos, tales como los nucleótidos adenosina o guanosina.

Como alternativa, la sustitución de nucleótidos de pirimidina mediante análogos modificados, por ejemplo, se tolera la sustitución de salientes en la posición 3' de 2 nucleótidos de uridina por 2'-desoxitimidina y no influye en la eficacia del ARNi. La ausencia de un grupo hidroxilo en la posición 2' aumenta de forma significativa la resistencia a la nucleasa del saliente en el medio de cultivo tisular.

Las moléculas de ARN usadas en los métodos se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, el ARN se puede sintetizar de forma química o producir de forma recombinante usando métodos conocidos en la técnica. Tales métodos se describen en las Solicitudes de Patente Publicadas de Estados Unidos N^{os} US2002-0086356A1 y US2003-0206884A1.

Los métodos que se describen en el presente documento se usan para identificar o para obtener moléculas de ARN que son útiles como mediadores específicos de secuencias de degradación de ARNm específico del cáncer y, por lo tanto, para la inhibición de proteínas que contribuyen al funcionamiento de las células cancerígenas. La expresión de ABCB5, por ejemplo, se puede inhibir en seres humanos con el fin de evitar que la proteína se traduzca y por lo tanto evitando su función *in vivo*.

En los métodos se puede usar cualquier ARN, con la condición de que tenga una homología suficiente con respecto al gen específico de cáncer para mediar el ARNi. El ARN puede corresponder a todo el gen específico de cáncer o a una parte del mismo. No existe un límite superior para la longitud del ARN que se puede usar. Por ejemplo, el ARN puede variar de aproximadamente 21 pares de bases (pb) del gen hasta la longitud completa del gen o superior. En una realización, el ARN usado en los métodos tiene una longitud de aproximadamente 1000 pb. En otra realización, el ARN tiene una longitud de aproximadamente 500 pb. En otra realización más, el ARN tiene una longitud de aproximadamente 22 pb. En ciertas realizaciones, la longitud del ARN preferente es de 21 a 23 nucleótidos. La secuencia de ABCB5 se conoce, por ejemplo, véase el documento de Patente de Estados Unidos N^o 6846883 (que se refiere a ABCB5 como una P-glicoproteína 7p).

Las moléculas de unión a ABCB5 se administran al sujeto en una cantidad eficaz para el tratamiento del cáncer. Una "cantidad eficaz para el tratamiento del cáncer" es una cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un compuesto podría ser la cantidad necesaria para (i) eliminar una célula cancerígena; (ii) inhibir el crecimiento adicional del cáncer, es decir, detener o ralentizar su desarrollo; y/o (iii) sensibilizar una célula cancerígena con un agente anticáncer o terapéutico. De acuerdo con algunas divulgaciones en el presente documento, una cantidad eficaz es la cantidad de un compuesto sola o en

combinación con un medicamento para el cáncer, que cuando se combina o coadministra o administra solo, da como resultado una respuesta terapéutica al cáncer, ya sea en la prevención o en el tratamiento del cáncer. El efecto biológico puede ser la mejora y/o la eliminación absoluta de los síntomas que surgen por el cáncer. En otra realización, el efecto biológico es la eliminación completa del cáncer, tal como se pone en evidencia por ejemplo, mediante la ausencia de un tumor o una biopsia o un frotis de sangre que está libre de células cancerígenas.

La cantidad eficaz de un compuesto en el tratamiento de un cáncer o en la reducción del riesgo de desarrollar un cáncer puede variar dependiendo del compuesto específico usado, el modo de administración del compuesto, y de sí se usa solo o en combinación. La cantidad eficaz para cualquier aplicación en particular también puede variar dependiendo de factores tales como el cáncer que se está tratando, el compuesto en particular que se está administrando, es tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto habitual en la materia puede determinar de forma empírica la cantidad eficaz de una molécula en particular sin la necesidad de experimentación indebida. En combinación con las enseñanzas que se proporcionan en el presente documento, mediante la elección entre los diversos compuestos activos y factores ponderales tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de los efectos secundarios adversos y modo de administración preferente, se puede planificar un tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no provoque una toxicidad básica y que además sea totalmente eficaz para tratar al sujeto en particular.

Las dosis objeto de los compuestos que se describen en el presente documento por lo general varían de aproximadamente 0,1 µg a 10,000 mg, more más habitualmente de aproximadamente 1 µg/día a 8000 mg, y lo más habitualmente de aproximadamente 10 µg a 100 µg. Indicado en términos de peso corporal del sujeto, las dosificaciones habituales varían de aproximadamente 0,1 µg a 20 mg/kg/día, more habitualmente de aproximadamente de 1 a 10 mg/kg/día, y lo más habitualmente de aproximadamente 1 a 5 mg/kg/día. La cantidad absoluta dependerá de una diversidad de factores que incluyen el tratamiento simultáneo, el número de dosis y parámetros individuales del paciente que incluyen edad, condición física, tamaño y peso. Estos son factores bien conocidos por los expertos habituales en la materia y se pueden dirigir con no más que experimentación de rutina. Por lo general es preferente que se use una dosis máxima, es decir, la dosis segura más elevada de acuerdo con el criterio médico coherente.

También se contemplan múltiples dosis de las moléculas. En algunos casos, cuando las moléculas se administran con un medicamento para el cáncer, se usa una dosificación subterapéutica de cualquiera de las moléculas o el medicamento para el cáncer, o una dosificación subterapéutica de ambos, en el tratamiento de un sujeto que padece, o está en riesgo de desarrollar, cáncer. Cuando las dos clases de fármacos se usan en conjunto, el medicamento para el cáncer se puede administrar en una dosis subterapéutica para producir un resultado terapéutico deseable. Una "dosis subterapéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a una dosificación que es inferior a la dosificación que produciría un resultado terapéutico en sujetos y se administrara en ausencia del otro agente. Por lo tanto, la dosis subterapéutica de un medicamento para el cáncer es una que no produciría el resultado terapéutico deseado en el sujeto en ausencia de la administración de las moléculas. Algunas dosis terapéuticas para de medicamentos para el cáncer se conocen bien en el campo de la medicina para el tratamiento del cáncer. Estas dosificaciones se han descrito ampliamente en referencias tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., 1990; así como otras muchas referencias médicas que confían en la profesión médica como guía para el tratamiento del cáncer. En la técnica también se han descrito dosificaciones terapéuticas de anticuerpos.

Se dispone de una diversidad de vías de administración. El modo seleccionado en particular dependerá, por supuesto, del anticuerpo anti-ABCB5 en particular seleccionado, de la afección en particular que se está tratando y de la dosificación necesaria para la eficacia terapéutica. Los métodos, hablando en términos generales, se pueden poner en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produce niveles de protección eficaces sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Los modos de administración preferentes son las vías parenterales. El término "parenteral" incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, e intraesternal, o técnicas de infusión. Otras vías incluyen, pero no sin limitación, la vía oral, nasal, dérmica, sublingual, y local.

Las formulaciones se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener de forma rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

Los compuestos se pueden administrar mediante cualquier ruta habitual para la administración de medicaciones. Dependiendo del tipo de cáncer a tratar, los compuestos se pueden ignorar, ingerido administrar mediante vías sistémicas. Las vías sistémicas incluyen la vía oral y la parenteral. Las medicaciones inhaladas son preferentes en algunas realizaciones debido a la administración directa al pulmón, en particular en pacientes con cáncer de pulmón. Varios tipos de inhaladores de dosis medida se usan regularmente para administración mediante inhalación. Estos tipos de dispositivos incluyen inhaladores de dosis medida (MDI), MDI accionados por la respiración, inhalador de polvo seco (DPI), cámaras espaciadoras/de alojamiento en combinación con MDI, y nebulizadores. Las vías de administración preferentes incluyen, pero no se limitan a, oral, parenteral, intramuscular, intranasal, intratraqueal, intratecal, intravenosa, inhalación, ocular, vaginal, y rectal. Para uso en terapia, se puede administrar una cantidad

eficaz de los compuestos a un sujeto mediante cualquier modo que administre el ácido nucleico al órgano o tejido afectado. La "administración" de la composición farmacéutica se puede conseguir mediante cualquier medio conocido por la persona experta.

- 5 De acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento, el péptido se puede administrar en una composición farmacéutica. En general, una composición farmacéutica comprende el péptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Algunos vehículos farmacéuticamente aceptables para péptidos, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de anticuerpos son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Como se usa en el presente documento, un vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos, por ejemplo, la capacidad del péptido para unirse a ABCB5.

15 Algunos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, agentes estabilizantes, agentes solubilizantes y otros materiales que son bien conocidos en la técnica. Algunos vehículos farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo para péptidos en particular se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.211.657. Tales preparaciones pueden contener habitualmente sales, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar sales no farmacéuticamente aceptables de forma conveniente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no se excluyen de la divulgación. Tales sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes hacia: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico, y similares. Además, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metales alcalinos metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

25 Los péptidos se pueden formular en preparaciones en formas sólida, semisólida, líquida o gaseosa tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, funciones, depósitos, inhalantes e inyecciones, y las vías normales para administración oral, parenteral o quirúrgica. También se describen composiciones farmacéuticas que se formulan para administración local, tales como mediante implantes.

30 Las composiciones adecuadas para administración oral se pueden presentar comunidades separadas, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, cada una conteniendo una cantidad predeterminada del principio activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

35 Cuando los compuestos que se describen en el presente documento (incluyendo variedades peptídicas y no peptídicas) se usan de forma terapéutica, en ciertas realizaciones una vía de administración deseable puede ser mediante aerosol pulmonar. Las técnicas para preparar sistemas de administración de aerosol que contienen compuestos son bien conocidas por los expertos en la materia. Generalmente, tales sistemas deberían usar componentes que no alteren de forma significativa las propiedades biológicas de los péptidos (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, "Aerosols", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, pp 1694-1712). Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y condiciones para producir aerosoles sin recurrir a experimentación indebida.

45 Los péptidos se pueden administrar directamente un tejido. Preferentemente con el tejido es uno en el que se encuentran las células madre cancerígenas. Como alternativa, el tejido es uno en el que es probable que aparezca el cáncer. La administración directa al tejido se puede conseguir mediante inyección directa. Los péptidos se pueden administrar una vez, o como alternativa se pueden administrar en una pluralidad de administraciones. Si se administran múltiples veces, los péptidos se pueden administrar a través de diferentes rutas. Por ejemplo, las primeras administraciones (o unas pocas de las primeras) se pueden realizar directamente en el tejido afectado mientras que las administraciones posteriores pueden ser sistémicas.

50 Para administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente mediante la combinación de los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, la ingestión oral por un sujeto a tratar. Algunas preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de la adición de agentes auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. En particular, algunos excipientes adecuados son cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinil pirrolidona reticulada, goma de agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en solución salina o tampones para neutralizar las condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin vehículo.

Los núcleos de gragea se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los revestimientos de comprimidos o grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los principios activos mezclados con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, agentes estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. También se pueden usar microesferas formuladas para administración oral. Tales microesferas se han definido bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral se deberían presentar en dosificaciones adecuadas para tal administración.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Los expertos en la materia conocen bien algunas técnicas para preparar sistemas de administración de aerosol. Por lo general, tales sistemas deberían usar componentes que no alteren de forma significativa las propiedades biológicas del principio activo (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, "Aerosols", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, pp 1694-1712). Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y condiciones para la producción de aerosoles sin recurrir a la experimentación indebida.

Los compuestos, cuando es deseable su administración por vía sistémica, se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Algunas preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Algunos vehículos acuosos incluyen, soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas/alcohólicas, que incluyen solución salina y medios tamponados. Algunos vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada, o aceites no volátiles. Algunos vehículos intravenosos incluyen fluidos y reponedores de nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. Algunos conservantes y otros aditivos pueden también estar presentes tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y gases inertes y similares. Las dosis más bajas resultarán de otras formas de administración, tales como administración intravenosa. En el caso en el que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden usar dosis más elevadas (o dosis más elevadas de forma eficaz mediante una vía de administración más localizada y diferente) hasta el punto que permita la tolerancia del paciente. Se contemplan múltiples dosis al día para conseguir niveles sistémicos apropiados de los compuestos.

Además, en otras realizaciones, el vehículo precedente es una micropartícula o implante biocompatibles que es adecuado para implante en el receptor mamífero. Algunos implantes bioerosionables a modo de ejemplo que son útiles de acuerdo con este método se describen en la Solicitud Internacional de PCT N° PCT/US/03307 (Publicación N° WO 95/24929, con el título "Polymeric Gene Delivery System", que reivindica la prioridad de la solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de serie 213.668, presentada el 15 de marzo de 1994). El documento de patente PCT/US/0307 describe una matriz polimérica biocompatible, preferentemente biodegradable para contener una macromolécula biológica. La matriz polimérica se puede usar para conseguir la liberación sostenida del agente en un sujeto. El agente que se describe en el presente documento se puede encapsular o dispersar dentro de la matriz polimérica biocompatible, preferentemente biodegradable que se desvela en el documento de patente PCT/US/03307. La matriz polimérica se encuentra preferentemente en forma de una micropartícula tal como una microesfera (en la que el agente se dispersa por toda la matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en la que el agente se almacena en el núcleo de una cobertura polimérica). Otras formas de la matriz polimérica para contener el agente incluyen películas, revestimientos, geles, implantes, y endoprótesis vasculares. El tamaño y la composición

del dispositivo de matriz polimérica se seleccionan para dar como resultado una cinética de liberación favorable en el tejido en el que está implantado el dispositivo de la matriz. El tamaño del dispositivo de la matriz polimérica se selecciona adicionalmente de acuerdo con el método de administración que se va a usar, por lo general inyección en un tejido o administración de una suspensión mediante aerosol en las áreas nasal y/o pulmonar. La composición de la matriz polimérica se puede seleccionar para que tenga tanto tasas de degradación favorables como también para que se forme a partir del material que es bioadhesivo, para aumentar adicionalmente la eficacia de la transferencia cuando el dispositivo se administra a una superficie vascular, pulmonar, u otra distinta. La composición de la matriz también se puede seleccionar para que no se degrade, pero en su lugar, para que se libere mediante difusión durante un periodo de tiempo prolongado.

Las matrices poliméricas tanto no biodegradables como biodegradables se pueden usar para administrar los agentes al sujeto. Las matrices biodegradables son preferentes. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Los polímeros sintéticos son preferentes. El polímero se selecciona basándose en el periodo de tiempo sobre el que se desea la liberación, por lo general del orden de unas pocas horas hasta un año o un periodo superior. Por lo general, la liberación en un periodo de tiempo que varía entre unas pocas horas y de tres a doce meses es lo más deseable. El polímero opcionalmente se presenta en forma de un hidrogel que se puede absorber hasta aproximadamente un 90 % de su peso en agua y además, opcionalmente se reticula con iones polivalentes u otros polímeros.

En general, los agentes se pueden administrar usando el implante bioerosionable por medio de difusión, o más preferentemente, mediante la degradación de la matriz polimérica. Algunos polímeros sintéticos a modo de ejemplo que se pueden usar para formar el sistema de administración biodegradable incluyen: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, alquilcelulosa, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboxietil celulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes de vinilo), acetato de polivinilo, poli cloruro de vinilo, poliestireno y que polivinilpirrolidona.

Algunos ejemplos de polímeros no biodegradables incluyen etilen vinil acetato, ácido poli(met)acrílico, poliamidas, copolímeros y mezclas de los mismos.

Algunos ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), y poli(lactida-cocaprolactona), y polímeros naturales tales como alginato y otros polisacárido se incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones hechas de forma rutinaria por los expertos en la materia), albúmina y otras proteínas hidrófilas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan ya sea mediante hidrólisis enzimática o exposición al agua *in vivo*, mediante erosión superficial o en masa.

Algunos polímeros bioadhesivos de interés en particular incluyen hidrogeles bioerosionables que se describen en H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación en el tiempo, de liberación retardada o de liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas del péptido, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración de liberación y son conocidos por los expertos habituales en la materia. Éstos incluyen sistemas de base de polímero tales como poli(lactida-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico, y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros mencionados anteriormente que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di, y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos formados por compresión usando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Algunos ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el agente reductor de plaquetas está contenido en una forma dentro de una matriz tales como las que se

describen en las patentes de Estados Unidos N^{os} 4.452.775, 4.675.189, y 5.736.152 y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo se permea a una tasa controlada a partir de un polímero tal como se describe en las patentes de Estados Unidos N^{os} 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden usar sistemas de administración de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para su implantación.

5 El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento profiláctico de sujetos en riesgo de desarrollar un cáncer recurrente. Liberación a largo plazo, como se usa en el presente documento, se refiere a que implante está formado y colocado para la administración de niveles terapéuticos del principio activo durante al menos 30 días, y preferentemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos habituales en la materia e incluyen algunos de los sistemas de administración que se han descrito anteriormente.

15 Algunas formulaciones terapéuticas de los anticuerpos se pueden preparar para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Algunos vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes se incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos precursores como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN[™], PLURONICS[™] o polietilenglicol (PEG).

30 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ejemplos específicos de la práctica de la presente invención y no se pretende que limiten al alcance de la invención. Tal como será evidente para un experto habitual en la materia, la presente invención encontrará aplicación en una diversidad de composiciones y métodos.

Ejemplos

35 Materiales y Métodos:

Células de melanoma y métodos de cultivo. La línea celular de melanoma maligno humano G3361, derivada de una sola célula tumoral clonada en agar blando, fue proporcionada por el Dr. Emil Frei III (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA), la línea celular A375 está disponible en el mercado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, VA). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10 %, 6 mmol/l de HEPES, 2 mmol/l de L-glutamina, y 100 IU/ml de penicilina/estreptomina a 37 °C y CO₂ al 5 % en una incubadora modificada tal como se ha descrito anteriormente. Las líneas de células G3361/DsRed2 y G3361/EYFP se generaron mediante transfección establece células de melanoma G3361 con cualquiera de proteína fluorescente de color rojo de *Discosoma sp.* (DsRed2) o la variante potenciada de color amarillo-verde (EYFP) de la proteína fluorescente de color verde de *Aequorea victoria* (GFP) en conjunto con la señal de retención nuclear del antígeno T grande del virus 40 de simio (Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. y Smith, A. E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell 39, 499-509 (1984)), usando vectores de expresión de mamífero pDsRed2-Nuc o pEYFP-Nuc que también contienen un casete de resistencia a neomicina (BD Biosciences, Palo Alto, CA.) y el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) tal como se ha descrito anteriormente. Los cultivos de G3361/DsRed y G3361/EYFP clonales se generaron a partir de cultivos transfectar dos de forma estable mediante dilución limitante. Las células de melanoma clínicas (*n* = 6 pacientes) se derivaron de forma reciente a partir de muestra de ensayo quirúrgica de acuerdo con protocolos de investigación en sujetos humanos aprobados por los IRB de la Universidad de la Würzburg Medical School o el Instituto Wistar, Filadelfia, PA.

55 **Anticuerpos.** En el presente documento se usó el mAb de 3C2-1D12 anti-ABCB5 de IgG1k específico en los estudios de expresión. El mAb de 3C2-1D12 conjugado con FITC se usó para someter a ensayo la pureza de subconjuntos de melanoma ABCB5⁺ y ABCB5⁻ ordenados melanoma. Los mAb de control de isotipo de ratón MOPC-31C sin conjugar o conjugados con FITC, Ab secundario de IgG de cabra anti-ratón conjugado con FITC, CD20 anti-humano conjugado con ficoeritrina (PE), mAb de CD31 anti-humanos y de control isotipo se adquirieron en PharMingen, San Diego, CA. Los mAb secundarios conjugados con alofocianina (APC) y conjugados con PE se adquirieron en eBioscience, San Diego, CA. Los mAb de TIE-1 anti-humano sin conjugar, BMPR1a anti-humano, VE-cadherina anti-humana conjugada con PE y Nestina anti-humana eran de R&D Systems, Minneapolis, MN. Los siguientes anticuerpos se usaron para inmunohistoquímica y tinción de inmunofluorescencia de ABCB5, TIE-1 y VE-cadherina: mAb de ratón anti-ABCB5 (Frank, N. Y. *et al.* ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. Cancer Res 65, 4320-33 (2005); Frank, N. Y. *et al.* Regulation of

progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* 278, 47156-65 (2003)), Ab secundario de IgG de caballo anti-ratón conjugado con HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA), Ab secundario de IgG de conejo anti-ratón conjugado con FITC (ZYMED Laboratories, San Francisco, CA), Ab de VE-cadherina de conejo anti-humano sin conjugar (proporcionado amablemente por Cell Signaling Technology, Danvers, MA), Ab de IgG de control de ratón (DAKO, Carpinteria, CA), mAb de TIE-1 de conejo anti humano sin conjugar (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), Ab secundario de IgG de burro anti-ratón conjugado con FITC, Ab secundario de IgG de burro anti-conejo conjugado con Rojo Texas, Ab secundario de IgG de burro anti-conejo conjugado con Cy3, y Ab de IgG de control de conejo (todos de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).

10 **Histopatología e inmunohistoquímica.** Criosecciones de melanoma de 5 micrómetros de espesor se fijaron en acetona a -20 °C durante 5 minutos. Las secciones secadas al aire se incubaron con 10 µg/ml de mAb de ABCB5 a 4 °C durante una noche; se usaron 10 µg/ml de IgG de ratón como control negativo. Las secciones se lavaron con PBS x 3 durante 5 minutos y se incubaron con Ab de IgG de caballo anti-ratón conjugada con peroxidasa a 1:200 para tinción de ABCB5. Para el marcado de doble fluorescencia de ABCB5/VE-cadherina o ABCB5/TIE-1, se fijaron secciones de melanoma de 5 µm en acetona a -20 °C durante 5 minutos. Las secciones secadas al aire se incubaron con 10 µg/ml de mAb de ABCB5 y 2,5 µg/ml de Ab de VE-cadherina o TIE-1 a 4 °C durante una noche; se usaron 10 µg/ml de IgG de ratón y 2,5 µg/ml de IgG de conejo como controles negativos. Las secciones se lavaron con Tween 20 al 0,05 % que contiene PBS durante 5 minutos x 3 y se incubaron con una dilución a 1:150 de Ab de IgG de burro anti-conejo conjugado con Rojo Texas o conjugado con Cy3 y Ab de IgG de conejo anti-ratón conjugado con FITC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavados posteriores, las secciones se montaron con un medio de montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories) y se cubrieron con cubre objetos. La reactividad por inmunofluorescencia se visualizó en un microscopio de sistema BX51/52 de Olympus acoplado a un sistema Cytovision (Applied Imaging, San Jose, CA).

25 **Diseño y análisis de micromatriz de tejido.** La Progresión Tumoral Melanocítica TMA es el producto de un esfuerzo conjunto de los tres SPORES de piel (Harvard, M.D. Anderson, Universidad de Pensilvania). Esta matriz contiene 480 x 0,6 mm núcleos de tejido tumoral que representan cuatro tipos principales de diagnóstico de tumor: nevus benigno, melanoma cutáneo primario, metástasis en ganglios linfáticos y metástasis visceral. Los casos se recogieron en los servicios de Patología de las tres instituciones participantes. Para fines de control de calidad, se eligen dos núcleos por duplicado en cada región distinta. Los nevus y los melanomas primarios presentaban cualquiera de una región o tres regiones de bloque de tejido muestreado (2 o 6 núcleos), mientras que los tumores metastásicos tenían una región muy estudiada para cada bloque. Por lo tanto, los 480 núcleos representan 2 núcleos adyacentes de 240 regiones histológicas distintas. Esta matriz incluye 130 núcleos de 35 nevus, 200 núcleos de 60 melanomas primarios y 150 núcleos de 75 lesiones metastásicas. De forma operativa, los nevus finos y los melanomas finos implicaban solamente las dermis superficial/papilar, mientras que los nevus gruesos y los melanomas gruesos habían crecido para implicar la dermis tanto papilar como profunda (reticular). Esta matriz se preparó en el laboratorio del Dr. Mark Rubin (Departamento de Patología del Hospital Brigham and Women y en el Instituto del Cáncer Dana Farber, Boston). Las secciones histológicas del portaobjetos de la matriz tisular se calentaron a 58 °C durante 20 minutos y a continuación se trataron como sigue a continuación: xileno x 2 (1 hora, 10 minutos), etanol al 100 % x 2 durante 2 minutos, etanol al 95 % durante 2 minutos, y dH₂O x 3 durante 2 minutos. La recuperación del antígeno se realizó en tampón citrato 10 mMol, pH 6,0 con ebullición en olla a presión durante 10 minutos y a continuación se enfrió a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS x 2 durante 5 minutos, el tejido se bloqueó con suero de caballo al 10 % y BSA al 1 % en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se incubó con 5 µg/ml de mAb ABCB5 a 4 °C durante una noche. A continuación, el tejido se lavó con PBS-Tween 20 al 0,05 % x 3 durante 5 minutos y a continuación se trató con H₂O₂ al 3 %/PBS durante 15 minutos. Después de aclarar en PBS, las secciones se incubaron con Ab de IgG de caballo anti-ratón biotinilado a 1:200 a temperatura ambiente durante 30 minutos, se aclaró en PBS-Tween x 3 durante 5 minutos, y se incubó con complejo de avidina-biotina-peroxidasa de rábano picante (Vector Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La inmunorreactividad se detectó usando sustrato NovaRed (Vector Laboratories). El Sistema Automatizado de Formación de Imágenes Celulares de Chromavision (ACIS) se usó para cuantificar la intensidad de la inmunotinción de ABCB5 y mIgGIR en la micromatriz de tejido HTMA 84. Los valores de intensidad del portaobjetos de control (fondo más melanización intrínseca) se restaron del portaobjetos experimental y se consideró que la diferencia en los valores de intensidad para cada núcleo era la tinción real. Este gráfico (véase la Figura 1) muestra un intervalo de confianza de un 95 % para la diferencia de intensidad para cada diagnóstico de patología. Los valores de P entre grupos relevantes se calcularon usando el ensayo de t independiente/para muestras. El número sobre cada barra de error muestra el número de casos dentro de cada grupo.

60 **Análisis de citometría de flujo de expresión de ABCB5.** El análisis de la coexpresión de ABC5 con los marcadores de superficie CD20, CD31, VE-cadherina, o BMPR1a o los marcadores intracelulares de Nestina o TIE-1 en suspensiones de células de melanoma clínico derivadas de paciente se realizó mediante citometría de flujo en color dual tal como se ha descrito anteriormente. Las células de melanoma clínico se incubaron con mAb anti-ABCB5 o mAb de control de isotipo o sin Ab seguido de contratinción con IgG de burro anti-ratón conjugada con APC. A continuación, las células se fijaron en PBS que contenía Paraformaldehído al 2 % (30 min a 4 °C), y posteriormente se incubaron con los mAb anti-CD20 conjugado con PE, anti-CD31, anti-VE-cadherina, anti-Nestina o control de isotipo conjugado con PE, o los mAb anti-BMPR1a sin conjugar, anti-TIE-1 o de control de isotipo sin conjugar seguido de contratinción con anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulina conjugados con PE o con FITC.

Las etapas de lavado con tampón de tinción o tampón de permeabilización de saponina al 1 % se realizaron entre cada etapa. Posteriormente se realizó citometría de flujo en color cual con adquisición de emisión de fluorescencia en los espectros F11 (FITC) o F12 (PE) y F14 (APC) en un FACScan de Becton Dickinson (Becton Dickinson, San Jose, CA) tal como se ha descrito. Las diferencias estadísticas en los niveles de expresión de los marcadores enumerados anteriormente mediante células ABCB5⁺ y ABCB5⁻ se determinaron usando el ensayo de Mann-Whitney no paramétrico. Un valor de *P* de dos lados de *P* < 0,05 se consideró significativo. Las células de melanoma A375 se analizaron a la expresión de ABCB5 de superficie mediante incubación con mAb anti-ABCB5 o mAb de control de isotipo (10 µg/ml) seguido de contratinción con anticuerpo secundario de inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugado con FITC y citometría del flujo de un solo color (F11) como se ha descrito.

Aislamiento celular. Se generaron suspensiones de células individuales a partir de xenoinjertos de melanoma humano después de disección quirúrgica de tumores de ratones Balb/c NOD/SCID o ratones atímicos Balb/c sacrificados 8 semanas después de la inoculación de células tumorales. Cada tumor se cortan piezas pequeñas (aprox. 1 mm³) y los fragmentos del tumor se incubaron posteriormente en 10 ml de PBS estéril que contiene 0,1 g/l de cloruro cálcico y 5 mg/ml de Colagenasa Serva NB6 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania) durante 3 horas a 37 °C en una plataforma de agitación a 200 rpm para generar suspensiones de células individuales. Posteriormente, las células tumorales se lavaron con PBS para retirar el exceso de colagenasa. Las células ABCB5⁺ se aislaron mediante selección positiva y las poblaciones de células ABCB5⁻ se generaron retirando células ABCB5⁺ usando marca o con mAb anti-ABCB5 y clasificación de células con perla magnética como se ha descrito. En resumen, células de melanoma G3361 o A375 humano o suspensiones de células individuales derivadas de xenoinjertos de melanoma humano o muestras de melanoma clínicos se marcaron con mAb anti-ABCB5 (20 µg/ml) durante 30 min a 4 °C, se lavaron para retirar el exceso de anticuerpo, seguido de incubación con microperlas magnéticas revestidas con mAb de IgG anti-ratón secundario (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y posterior separación de células mediante pasaje dual en con una separación MiniMACS (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La pureza de los aislados de células ABCB5⁺ y células de melanoma G3361 humano ABCB5⁻ se sometieron a ensayo mediante análisis de citometría de flujo de expresión de ABCB5 (F11) en un aparato FACSCalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) después de incubación con mAb anti-ABCB5 conjugado con FITC, seguido de incubación con microperlas revestidas con mAb de IgG anti-ratón y clasificación de células magnética. Las diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ABCB5 entre células de melanoma G3361 humano sin segregar, ABCB5⁺, y ABCB5⁻ se determinaron usando ANOVA de una vía seguido de la corrección de Bonferroni. Un valor de *P* de los lados de *P* < 0,05 se consideraba estadísticamente significativo.

Animales. Los ratones atímicos Balb/c y los ratones Balb/c NOD/SCID se adquirieron en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones se mantuvieron de acuerdo con las directrices institucionales del Hospital Infantil de Boston y Harvard Medical School y los experimentos se realizaron de acuerdo con protocolos experimentales aprobados.

Xenotrasplante de melanoma humano. Células G3361 humanas sin segregar, ABCB5⁺, o ABCB5⁻ (10⁷, 10⁶, o 10⁵/inóculo, respectivamente), o A375 humano (2 x 10⁶, 2 x 10⁵, o 2 x 10⁴/inóculo, respectivamente), o células de melanoma derivadas de paciente clínico (10⁶/inóculo, respectivamente), o células ABCB5⁺ o ABCB5⁻ aisladas de xenoinjertos de tumor G3361 primario derivados de ABCB5⁺ (10⁷/inóculo, respectivamente) se inyectaron s.c. uni- o bilateralmente en los costados del ratón Balb/c NOD/SCID receptor. La formación/crecimiento tumoral se sometió al ensayo semanalmente con un intervalo de tiempo, al menos hasta el punto final de 8 semanas, a menos que un tamaño excesivo del tumor requiriera una eutanasia temprana estipulada por protocolo, mediante la determinación del volumen del tumor (TV) de acuerdo con la fórmula establecida [TV (mm³) = π / 6 x 0.5 x longitud x (ancho)²]. Con respecto a la formación de tumor, los ratones se consideraban negativos para tumor si no se identificaba tejido tumoral después de la necropsia. Las diferencias estadísticamente significativas en la formación del tumor primario y secundario se evaluaron usando el ensayo Exacto de Fisher. Las diferencias en los volúmenes del tumor se determinaron usando ANOVA de una vía seguido de la corrección de Bonferroni o del Ensayo de Kruskal-Wallis seguido de corrección de Dun, con valores de *P* de dos colas < 0,05 considerados significativos.

Rastreo del linaje genético *in vivo*. Se reconstituyeron poblaciones de células tumorales G3361 humanas ABCB5⁺/DsRed2 y ABCB5⁻/EYFP, generadas usando clasificación de células con perla magnética tal como se ha mencionado anteriormente a proporciones de abundancia relativa de 1 x 10⁵ y 9 x 10⁶ células, respectivamente, seguido de determinación de las relaciones de células resultantes en inóculos mediante citometría de flujo en color dual (representaciones de F11 (EYFP) con respecto a F12 (DsRed2)) antes del xenotrasplante. Los cocultivos de G3361/DsRed2 y G3361/EYFP se inyectaron s.c. (10⁷ células/inóculo) en el costado derecho del ratón Balb/c NOD/SCID receptor. A las 4 o 6 semanas después del xenotrasplante, los tumores se cosecharon y se prepararon suspensiones de células individuales o secciones de tejido congelado como se ha mencionado anteriormente, para la determinación de la abundancia relativa *in vivo* de células de melanoma DsRed2⁺ y EYFP⁺ mediante citometría de flujo en color dual o microscopía de fluorescencia de suspensiones de células individuales derivadas de tumor (después de de la unión en placas de cultivo de tejido adherente), y para el análisis de 5 µm de secciones de tejido congelado mediante microscopía de fluorescencia. En experimentos adicionales, la abundancia relativa de células de melanoma DsRed2⁺ y EYFP⁺ se determinó en subconjuntos de células derivadas de xenoinjerto de ABCB5⁺ o ABCB5⁻ mediante citometría de flujo en color dual tal como se ha mencionado anteriormente y los porcentajes de células tumorales DsRed2⁺ and EYFP⁺ se compararon de forma estadística usando el ensayo de *t* de student sin

emparejar, con un valor de P de los lados de $P < 0,05$ considerado estadísticamente significativo.

Direccionamiento de mAb de anti-ABCB5. Se xenoinjertaron s.c. células de melanoma G3361 humano sin segregarse en ratones atímicos Balb/c receptores (10^7 /inóculo). Los animales se inyectaron i.p. con mAb anti-ABCB5 (clon 3C2-1D12), mAb de control de isotipo (500 μg /inyección) quincenalmente o sin Ab comenzando a las 24 horas antes del xenotrasplante de melanoma. El crecimiento tumoral se sometió al ensayo quincenalmente con un intervalo de tiempo mediante la determinación del volumen del tumor (TV) como se ha descrito anteriormente. Las diferencias en los volúmenes tumorales se determinaron usando ANOVA de una vía no paramétrica (Ensayo de Kruskal-Wallis) seguido de corrección de Dun para comparación de los tres grupos experimentales, con valores de P de dos colas $< 0,05$ considerados significativos. Para la determinación de la eficacia de unión de mAb anti-ABCB5 administrado *in vivo* para establecer xenoinjertos de melanoma de ser humano a ratón atímico, se generaron suspensiones de células individuales y secciones congeladas a partir de xenoinjertos de melanoma 24 horas después de la administración i.p. de mAb anti-ABCB5, mAb de control de isotipo de IgG1k murino, o sin tratamiento. Las suspensiones de células individuales preparadas se incubaron posteriormente con Ab secundario de Ig de cabra anti-ratón conjugado con FITC durante 30 min a 4°C y se analizaron mediante citometría de flujo de un solo color tal como se mencionó anteriormente, y las secciones congeladas se incubaron con secundario de Ig de caballo anti-ratón conjugado con HRP y se analizaron tal como se ha mencionado anteriormente.

Evaluación de ADCC y CDC. ADCC o CDC se determinaron mediante citometría de flujo en color dual tal como se destila anteriormente. En resumen, las suspensiones de células de melanoma G3361 humano melanoma en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco libre de suero (DMEM) (BioWhittaker, Walkersville, MD) se marcaron con 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina (DiO) (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. A continuación, las células de melanoma marcadas con DiO se sembraron a una densidad de 300.000 células por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos con fondo plano en 3 ml y se cultivaron el medio convencional en una incubadora unificada durante una noche. A partir de ese momento, las células diana de melanoma marcadas con DiO se preincubaron en presencia o ausencia de anti-ABCB5 o los mAb de control de isotipo (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente) durante 30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %, y posteriormente se cocultivaron durante un periodo adicional de 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % con o sin esplenocitos efectores de ratón atímico Balb/c recién aislados (12×10^6 células/pocillo, proporción de células diana a efectoras a 1:40) para evaluación de ADCC, o en presencia o ausencia de suero de ratón atímico Balb/c al 5 % para determinación de CDC. La continuación, las células y sus sobrenadantes cosecharon y se analizaron mediante citometría de flujo en color dual en un aparato FACSCalibur (Becton Dickinson) inmediatamente después de la adición de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio (PI) (Sigma, Milwaukee, WI), con células diana lisadas reconocidas mediante un fenotipo de DiO⁺PI⁺. Los niveles de ADCC para los tres grupos de tratamiento se calcularon como sigue a coordinación: [ADCC (%) = (porcentaje de positividad de la muestra para DiO⁺PI⁺) - (porcentaje medio de positividad de la muestra para DiO⁺PI⁺ sin tratar con Ab)]. Las diferencias en los niveles de ADCC se determinaron usando ANOVA de una vía no paramétrica (Ensayo de Kruskal-Wallis) seguido de corrección de Dun, con valores de P de dos colas $< 0,05$ considerados significativos.

Medidas de viabilidad celular. La viabilidad celular se midió en inóculos de células tumorales antes del xenotrasplante usando tinción con calceína-AM. En resumen, se incubaron 1×10^6 sin segregarse, células de melanoma ABCB5⁺, o ABCB5⁻ con calceína-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 30 min a 37 °C y CO₂ al 5 % para permitir la absorción del sustrato y la activación enzimática en el derivado fluorescente. A continuación, las células se lavaron y se adquirieron medidas de fluorescencia con citometría de flujo en el espectro de emisión F12 en un FACScan de Becton Dickinson. Las células que presentan generación del derivado de calceína-AM fluorescente se compararon con muestras sin exponer se consideraron viables. La viabilidad celular donde se determinan todas las muestras usando el método de exclusión con colorante azul de tripano.

Extracción de ARN y PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real. La extracción de ARN de células de melanoma humano G3361 y A375 y las reacciones de síntesis de ADNc convencionales se realizaron usando el Sistema de Síntesis SuperScript First-Strand para PCR de transcripción inversa (Invitrogen) tal como se ha descrito anteriormente. El Programa de Terapéutica para el Desarrollo del NCI/NIH proporcionó ARN total preparado a partir de 8 líneas de células de melanoma adicionales del panel NCI-60 (LOX IMVI, SK-MEL-5, M14, UACC-62, SK-MEL-28, UACC-257, SK-MEL-2, MALME-3M) mantenidas en el Instituto Nacional del Cáncer en condiciones y con números de pasaje que se han descrito anteriormente. Se realizó PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real para la expresión genética relativa de ABCB5 tal como se ha descrito anterior. La expresión de ABCB5 se evaluó mediante la relación del nivel de expresión en la muestra con respecto a la expresión media en todas las muestras, en $n = 3$ experimentos independientes. Los datos del crecimiento (tiempo de duplicación del cultivo) para las 8 líneas de células de melanoma humano del panel NCI-60 fueron las sostenidas por el Instituto Nacional del Cáncer, que se pueden encontrar en línea (http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common_files/cell_list.html). La cinética del crecimiento para las líneas de células de melanoma G3361 y A375 se estableció en el laboratorio de los inventores mediante recuento celular de acuerdo con la fórmula: tiempo de duplicación de la población (h) = $T_2 - T_1 / (\log_2(\text{recuento celular}_{T_2} / \text{recuento celular}_{T_1}))$, en la que T_2 y T_1 representan dos puntos temporales distintos (h) en la fase logarítmica de crecimiento en cultivo. Se realizaron la correlación lineal de la expresión relativa de ARNm de ABCB5 y los tiempos de duplicación del cultivo (h) y se calculó un coeficiente de correlación de Pearson y se usaron los criterios de $P < 0,05$ y $r > 0,3$ o $r < -0,3$ para identificar correlaciones significativas tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 1

Los inventores examinaron primero la relación de ABCB5 con respecto a la evolución clínica del melanoma maligno, debido a su asociación próxima con CD 166, un marcador de enfermedad más avanzada. Esto se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica de ABCB5 y análisis de imagen cuantitativo de una micromatriz de tejido de melanoma en evolución establecido (TMA) que contiene 480 núcleos de tejido de melanoma derivados de paciente (0,6 mm), que representan cuatro tipos de diagnóstico de tumor principales: nevus melanocítico benigno, melanoma cutáneo primario, metástasis por melanoma en los ganglios linfáticos, y metástasis por melanoma en vísceras (Figura 1a). Los inventores encontraron que los melanomas primarios o metastásicos expresaban ABCB5 de forma más significativa que los nevus melanocíticos benignos ($P < 0,001$), melanomas primarios gruesos que expresan más ABCB5 que los melanomas primarios finos ($P = 0,004$), y melanomas metastásicos en los ganglios linfáticos que expresan más ABCB5 que las lesiones primarias ($P = 0,001$), identificando ABCB5 como un nuevo marcador molecular de la evolución neoplásica en el melanoma maligno humano. La heterogeneidad aparente en la expresión de ABCB5 se indicó como metástasis, con mayor tinción en las metástasis en ganglio linfático que en víscera ($P = 0,025$).

Ejemplo 2

Cuando se someten a ensayo mediante citometría de flujo en suspensiones celulares individuales recién derivadas de una serie más pequeña de melanomas clínicos diseccionados de forma quirúrgica ($n = 6$ pacientes, Tabla 1), también se encontró que ABCB5 se expresaba de forma coherente en 6 de 6 muestras de ensayo, con una frecuencia de células tumorales ABCB5⁺ que varía de un 1,6 % a un 20,4 % ($9,2 \pm 3,2$ %, media \pm ETM) (Figura 1b, Tabla 1). La caracterización fenotípica adicional con respecto a antígenos asociados con un fenotipo molecular más primitivo reveló una expresión significativa de CD20 en 3 de 6 muestras de ensayo (frecuencia en todas las muestras: $0,3 \pm 0,2$ %, media \pm ETM), nestina en 6 de 6 ($31,9 \pm 7,8$ %), TIE-1 en 6 de 6 ($24,9 \pm 6,9$ %), VE-cadherina en 4 de 6 ($0,2 \pm 0,1$ %), BMPR1a en 6 de 6 ($1,8 \pm 1,0$ %), y del marcador CD31 del estroma en 5 de 6 muestras de ensayo ($0,8 \pm 0,4$ %) (Figura 1b). La expresión preferente mediante ABCB5⁺ en comparación con subpoblaciones de ABCB5⁻, tal como se ha identificado anteriormente para el determinante CD133 de células madre, se demostró por la presente en esas muestras que expresan los marcadores respectivos para la nestina ($49,4 \pm 6,6$ % con respecto a $26,6 \pm 4,9$ %, respectivamente, media \pm ETM; $P = 0,026$), TIE-1 ($59,4 \pm 7,8$ % con respecto a $23,8 \pm 7,5$ %, $P = 0,015$), VE-cadherina ($6,4 \pm 1,2$ % con respecto a $0,1 \pm 0,1$ %, $P = 0,029$), y BMPR1a ($37,0 \pm 4,4$ con respecto a $2,0 \pm 0,2$ %, $P = 0,002$), pero no para CD20 ($0,2 \pm 0,2$ % con respecto a $1,1 \pm 0,7$ %, NS), o CD31 ($2,4 \pm 1,2$ % con respecto a $0,5 \pm 0,3$ %, NS) (Figura 1c). La inmunohistoquímica *in situ* reveló células individuales ABCB5⁺ o grupos a tener en cuenta para una subpoblación minoritaria dentro de tumores clínicos con células teñidas de forma que se correlacionan predominantemente con regiones sin diferenciar, no melanizadas o expresión de TIE-1, y zonas no reactivas que corresponden a áreas más diferenciadas, melanizadas.

La **Tabla 1** resumen las características tumorales de seis pacientes con un sitio con melanoma (ya sea una metástasis o recurrente primario). Los tumores se cuantifican mediante el % de ABCB5⁺ presente. También se presenta un resumen de los resultados (número de ratones con tumores) para nueve grupos de ratones NOD/SCID que se trasplantaron con inóculos por replicado ($n = 2-10$) de células de melanoma humano ABCB5⁺ o ABCB5⁻ sin segregar.

Tabla 1 Características del paciente y del tumor

Paciente N°	Sitio del melanoma	ABCB5 ⁺ en el tumor (%)	Número de ratones trasplantados con tumores			
			Sin segregar	ABC B5-	AB CB5+	
1	P	Metástasis	8,5	0/2	0/2	2/2
2	P	Metástasis	1,6	1/2	0/2	2/2
3	P	Metástasis	3,2	5/5	1/5	5/5
4	P	Metástasis	20,4	N/A	N/A	N/A
5	P	Metástasis	17,4	N/A	N/A	N/A
6	P	Primario	4,2	N/A	N/A	N/A

Ejemplo 3

Para determinar si el subconjunto de células de melanoma definido por ABCB5 estaba enriquecido para MMIC, los inventores compararon las capacidades de celular melanoma purificadas con ABCB5⁺ (ABCB5⁺) con respecto a suprimidas con ABCB5⁻ (ABCB5⁻) para iniciar la formación del tumor *in vivo*, usando ya sea cultivos de melanoma humano cutáneo *clonal* establecido (G3361: positivo para un 2-10 % de ABCB5; A375: positivo para un 1-10 %, Figura 5a) o células de melanoma recién preparadas *derivadas del paciente* (Figura 1b, Tabla 1) en experimentos de

5 xenotrasplante de tumor de ser humano a ratón NOD/SCID. Se trasplantaron grupos de ratones NOD/SCID con inóculos por replicado ($n = 2-10$) de células de melanoma humano ABCB5⁺ o ABCB5⁻ sin segregar durante un intervalo de escala logarítmico a partir de dosis de células incapaces para iniciar de forma eficaz el crecimiento tumoral (G3361: 10^5 células, A375: 2×10^4 células) hasta dosis que iniciaban de forma coherente la formación del tumor cuando se usaban células ABCB5⁺ (G3361: 10^7 células, A375: 2×10^6 células, aislados de pacientes recién preparados: 10^6 células). La viabilidad celular determinada mediante tinción con calceína-AM superaba un 90 % en todos los inóculos de células tumorales y no diferían de forma significativa entre aislados (Figura 5b).

10 De 22 ratones agregados inyectados con células de melanoma ABCB5⁻ G3361 solamente 1 ratón trasplantado con la dosis celular más elevada generó un tumor (Figura 2a, panel a la izquierda). Por el contrario, 13 de 20 ratones inyectados con células ABCB5⁺ formaron tumores ($P < 0,0001$), incluyendo todos los ratones inyectados con la dosis celular más elevada (Figura 2a, panel a la izquierda, los valores de P adicionales para comparaciones individuales específicas de la dosis se proporcionan en la figura), indicando un enriquecimiento logarítmico > 2 para MMIC en este subconjunto celular, como se determina mediante comparación de dosis de inóculos necesarias para un 50 % de formación tumoral (TF_{50}) (Figura 2a, panel central).

20 Del mismo modo, de 21 ratones agregados inyectados con células de melanoma ABCB5⁻ A375, solamente 8 ratones desarrollaron tumor, mientras que 16 de 22 ratones inyectados con células ABCB5⁺ formaron tumores ($P < 0,05$), indicando un enriquecimiento logarítmico > 1 para MMIC entre las células ABCB5⁺ A375 (Figura 2b, paneles de la izquierda y del centro). La purificación de células ABCB5⁺ dio como resultado un enriquecimiento de 19,8 veces de la frecuencia de las células ABCB5⁺ de un $5,0 \pm 0,4$ % en cultivos sin segregar hasta un $98,8 \pm 0,8$ % (media \pm SD, $n = 3$, $P < 0,001$) cuando se someten a ensayo en muestras representativas que usan células de melanoma G3361, y la supresión de ABCB5⁺ dio como resultado una reducción de 4,75 veces de la frecuencia de las células ABCB5⁺ de un $5,0 \pm 0,4$ % a un $1,1 \pm 0,3$ % (media \pm SD, $n = 3$, $P < 0,001$) (Figura 5c). Esta contaminación residual (22 % de la frecuencia de ABCB5⁺ de origen natural) con las células ABCB5⁺ puede representar la formación del tumor observada mediante inóculos de ABCB5⁻ a las dosis más elevadas, sugiere una subestimación potencial del enriquecimiento de MMIC entre poblaciones de ABCB5⁺. En particular, en esos casos en los que la formación del tumor se producía como resultado de la inyección de células ABCB5⁻ a las dosis celulares más elevadas, presento se encontró que los tumores eran coherentemente más pequeños que los que resultaban de los xenoinjertos de ABCB5⁺ (G3361: Volumen del Tumor (TV) = 15 ± 15 con respecto a 286 ± 90 mm³, respectivamente, media \pm ETM, $P < 0,01$; A375: TV = 239 ± 70 con respecto a 832 ± 121 mm³, respectivamente, media \pm ETM, $P < 0,05$) (Figuras 2a y 2b).

35 Los xenoinjertos de cultivo de melanoma eran heterogéneos y estaban formados por células ABCB5⁺ que se correlacionaban predominantemente con regiones no melanizadas y expresión de VE-cadherina, y zonas de ABCB5⁻ correspondientes a áreas melanizadas (Figura 2c). Las células ABCB5⁺ repurificadas a partir de tumores primarios derivados de ABCB5⁺ formaron tumores secundarios de forma más eficaz que sus homólogos de ABCB5⁻ en 11 de 11 con respecto a 7 de 12 receptores, respectivamente ($P = 0,037$) (Figura 2d) y reestablecieron la heterogeneidad del tumor primario. De forma coherente con los resultados obtenidos usando sistemas de modelo de melanoma clonal, solamente 1 de 9 ratones receptores inyectados con 10^6 células de melanoma ABCB5⁻ derivadas de paciente recién preparadas desarrollaron un tumor, mientras que los 9 receptores de 10^6 células de melanoma ABCB5⁺ formaron tumores ($P < 0,001$), con el TV medio más pequeño en receptores de inóculos de ABCB5⁻ con respecto a inóculos de ABCB5⁺ (TV = 2 ± 2 con respecto a 35 ± 11 mm³, respectivamente, media \pm ETM, $P < 0,01$) (Figura 2e, Tabla 1). Los tumores generados a partir de células de melanoma ABCB5⁺ reestablecieron la heterogeneidad tumoral de origen natural con respecto a la expresión de ABCB5, tal como se determina mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo de muestra de ensayo de tumor disociado, con positividad para ABCB5 que varía de un 2 % a un 8 % (los resultados no se ilustran). Estos hallazgos establecen que la frecuencia de MMIC está notablemente enriquecida en la población minoritaria de melanoma definida por ABCB5.

50 Ejemplo 4

Para examinar directamente las contribuciones relativas del crecimiento tumoral de subpoblaciones de ABCB5⁺ y ABCB5⁻ co-xenoinjertadas, y para investigar adicionalmente la autorrenovación y la capacidad de diferenciación de ABCB5⁺, los inventores aislaron células de melanoma ABCB5⁺ o ABCB5⁻ a partir de variantes de línea celular G3361 transfectadas de forma estable que expresa ya sea proteína fluorescente de color rojo (DsRed2) o aumento de proteína fluorescente de color amarillo-verde (EYFP), respectivamente, un sistema modelo diseñado en el laboratorio los inventores para permitir el seguimiento del linaje genético *in vivo*. Los inventores encontraron que el xenotrasplante de cocultivos transfectantes de fluorocromo de ABCB5⁺ G3361/DsRed2 y de ABCB5⁻ G3361/EYFP reconstituidos a un $14,0 \pm 3,0$ % y un $86,0 \pm 3,0$ % de abundancia relativa (media \pm SD, $n = 6$), respectivamente, para ratones NOD/SCID dio como resultado frecuencias relativas que aumentan en serie, y que dependen del tiempo de células tumorales DsRed2⁺ de origen en ABCB5⁺ (pendiente de regresión lineal $6,4 \pm 1,0$, $P < 0,0001$) en tumores experimentales en comparación con inoculados, hasta una frecuencia de un $51,3 \pm 1,4$ % en el punto final experimental de 6 semanas (media \pm SD, $n = 3$, $P = 0,024$) (paneles superior e inferior de las Figuras 3a, 3b, y 3c). Estos hallazgos establecen una tumorigenicidad mayor de ABCB5⁺ con respecto a poblaciones en masa de melanoma ABCB5⁻ co-xenoinjertado en un modelo de desarrollo del tumor competitivo. De forma importante con estos resultados indican además que las células que inician el tumor pueden conducir además a poblaciones en

masa de cáncer más diferenciadas, y por sí mismas *no tumorigénicas* para también, aunque de forma menos eficaz, contribuir a un crecimiento de una masa tumoral. Algunos tumores experimentales también contenían células de melanoma con doble positivo para DsRed2/EYFP (paneles centrales de la Figura 3c), indicando que las células de tumor derivadas de ABCB5⁺, como los precursores cutáneos fisiológicos de ABCB5⁺ (Frank, N. Y. *et al.* Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. J Biol Chem 278, 47156-65 (2003)), y participan en la fusión celular con subconjuntos de ABCB5⁻.

Ejemplo 5

10 Cuando las células de melanoma ABCB5⁺ se purificaron a partir de tumores experimentales resultantes del co-xenotrasplante de transfectantes de fluorocromo ABCB5⁺ G3361/DsRed2 al 10 % y ABCB5⁺G3361/EYFP al 90 %, los inventores encontraron que un 92,9 ± 6,4 % (media ± SD, n = 3) de células fluorescentes eran de fenotipo DsRed2⁺ (origen en ABCB5⁺) (Figura 3d, panel superior izquierdo), demostrando una capacidad de autorrenovación de este subconjunto celular. No se encontraron células EYFP⁺ a niveles significativos (7,1 ± 6.4 %, media ± SD, n = 15 3) entre aislados de ABCB5⁺, y la baja frecuencia observada se tenía totalmente en cuenta en la magnitud mediante la contaminación de células ABCB5⁺ residual medida entre poblaciones de ABCB5⁻ EYFP⁺ coinjertadas (1,1 % de un 90 % de células EYFP⁺ = 0,99 % con respecto a un 10 % de células ABCB5⁺ DsRed2⁺ en inóculos), lo que indica que las células tumorales ABCB5⁺ surgen solamente de inóculos de ABCB5⁺ y que las células ABCB5⁻ dan lugar exclusivamente a progenie de ABCB5⁻. Además, los aislados de células tumorales ABCB5⁻ fluorescentes presentaban un 52,5 ± 0,8 % (media ± SD, n = 3) de positividad para DsRed2 (origen en ABCB5⁺) y un 47,5 ± 0,8 % de positividad para EYFP (origen en ABCB5⁻) (Figura 3d, panel inferior izquierdo), demostrando que las células de melanoma ABCB5⁺ poseen la capacidad para diferenciarse y dar lugar a poblaciones de tumor ABCB5⁻. Estos hallazgos muestran la existencia de una jerarquía tumoral en la que las células de melanoma ABCB5⁺, enriquecidas para MMIC, se autorrenuevan y dan lugar a progenie tumoral de ABCB5⁻ más diferenciada.

Ejemplo 6

Para diseccionar de forma mecánica si la población minoritaria enriquecida con MMIC, definida para ABCB5 es necesaria para la tumorigenicidad cuando se xenoinjertan *poblaciones en masa de tumor sin segregar*, los inventores examinaron si la muerte selectiva de este subconjunto de células puede inhibir el crecimiento y la formación. Un posible marcador molecular de células que inician el tumor no se ha abordado hasta la fecha para la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*. Los inventores administraron un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido a ABCB5 en un modelo de xenoinjerto de melanoma de ser humano a ratón atímico, porque los ratones atímicos, al contrario que los ratones NOD/SCID, son capaces de muerte de células tumorales mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Las células de melanomas en xenoinjertaron s.c. en ratones atímicos Balb/c receptores, los animales se inyectaron i.p. con mAb anti-ABCB5 o mAb de control quincenalmente comenzando a las 24 horas antes del xenotrasplante de melanoma, y la formación y el crecimiento del tumor se evaluaron en serie mediante medidas del TV como un intervalo de tiempo. La administración de mAb anti-ABCB5 dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral significativa en comparación con la determinada en ratones tratados con mAb o sin tratar de control durante el transcurso de un periodo de observación de 58 días (TV medio en el punto final de los 58 días para ratones tratados con mAb anti-ABCB5 (n = 11 ratones, ninguna muerte durante el periodo de observación) con respecto a ratones de control tratados con mAb (n = 10 ratones, excluyendo 1 muerte durante el periodo de observación) o con respecto a ratones sin tratar (n = 18 ratones, excluyendo 1 muerte durante el periodo de observación): 23 ± 16 con respecto a 325 ± 78 mm³, P < 0,01, o con respecto a 295 ± 94 mm³, P < 0,001, media ± ETM, respectivamente) (Figura 4a). El tratamiento con mAb de control no mostraba diferencia significativa en el crecimiento del tumor en comparación con la ausencia de tratamiento (Figura 4a). El tratamiento con mAb anti-ABCB5 también inhibía de forma significativa la *formación de tumor* evaluada a los 58 días después del xenotrasplante de células de melanoma, con tumores detectados solamente en 3 de 11 ratones tratados con mAb anti-ABCB5, con respecto a 10 de 10 ratones de control tratados con mAb y 18 de 18 animales de control sin tratar (P < 0,01 y P < 0,001, respectivamente) (Figura 4b).

Ejemplo 7

Los xenoinjertos de melanoma humano cultivados en ratones atímicos sin tratar, como los de los receptores NOD/SCID, presentan heterogeneidad tumoral y comprenden una población minoritaria de células ABCB5⁺ que se correlaciona de forma predominante con regiones no melanizadas sin diferenciar, y zonas de ABCB5⁻ que corresponden a zonas melanizadas y diferenciadas (Figura 4c). El análisis de la eficacia de unión *in vivo* reveló que mAb anti-ABCB5 administrado de forma sistémica, pero no el mAb de control, unido a un subconjunto de células tumorales en melanoma xenoinjertos de melanoma establecidos (Figura 4d) coherentes en magnitud con el subconjunto de células tumorales ABCB5⁺ (Figura 4c), tal como se determina de forma cuantitativa en suspensiones de células derivadas de xenoinjerto mediante citometría de flujo (Figura 4d), y también mediante inmunohistoquímica por detección de grupos de células teñidas de forma positiva.

Ejemplo 8

Para determinar el mecanismo de inhibición de la formación y crecimiento tumoral mediados por mAb anti-ABCB5, las respuestas efectoras inmunes ADCC y la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) se evaluaron mediante citometría de flujo en color dual tal como se ha descrito anteriormente. Cultivos diana de melanoma tratados con mAb anti-ABCB5, tratados con mAb de control o sin tratar se marcaron con el colorante de membrana fluorescente de color verde DiO y se contratiñeron con yoduro de propidio fluorescente de color rojo (PI, al que solamente son permeables las células lisadas), seguido de cocultivo con células inmunes efectoras sin marcar o derivadas de suero de bazos de ratones atímicos Balb/c. El de mAb anti-ABCB5 pero no el mAb de control de isotipo indujo de forma significativa la muerte de células diana de melanoma mediada por ADCC ($2,1 \pm 0,4$ % con respecto a $0,2 \pm 0,2$ %, respectivamente, $P < 0,05$) en una subpoblación de melanoma de tamaño comparable con el del subconjunto que expresa ABCB5 (Frank, N. Y. *et al.* ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 65, 4320-33 (2005)), tal como se determina a partir del porcentaje de células con doble positivo para DiO/PI (Figura 4e). La adición de suero a cultivos tratados con Ab en ausencia de células efectoras, o la adición de mAb anti-ABCB5 solo en estas condiciones experimentales no indujo una muerte celular significativa en comparación con los controles (los resultados no se ilustran), lo que sugiere que los efectos de mAb en CDC o tóxico directo no son causas significativas de inhibición de tumor en este sistema experimental.

Los efectos del direccionamiento de ABCB5 en xenoinjertos de melanoma *establecidos* de seres humanos ratones atímicos ($n = 13$ derivados de tres pacientes distintos $n = 10$ derivados de cultivos de melanoma establecidos), se examinaron con el fin de someter al ensayo la hipótesis de que la sección negativa para MMIC a través de la supresión de células ABCB5⁺ mediada por ADCC inhibe el crecimiento tumoral. Tal resultado se observaría en una situación *in vivo* dinámica si el subconjunto de melanoma de ABCB5⁺ es crítico para la tumorigénesis sólida.

Se realizó la caracterización de melanoma humano ABCB5⁺ o ABCB5⁻ usadas en experimentos de xenotrasplante. La administración de mAb anti-ABCB5 *in vivo*, comenzara 14 días después de la inoculación de células tumorales cuando se establecieron los xenoinjertos (día 0), anula el crecimiento tumoral significativo observado en grupos tratados con mAb de control de isotipo o sin tratar durante el transcurso de un periodo de tratamiento de 21 días ($P < 0,001$ y $P < 0,001$, respectivamente) e inhibían de forma significativa el volumen tumoral medio en comparación con el determinado ya sea en ratones tratados con mAb de control o sin tratar (TV para ratones tratados con mAb anti-ABCB5 ($n = 23$ ratones) con respecto a ratones tratados con mAb de control ($n = 22$ ratones) o con respecto a ratones sin tratar ($n = 22$ ratones): $32,7 \pm 9,4$ con respecto a $226,6 \pm 53,8$ mm³, $P < 0,001$, o con respecto a $165,4 \pm 36,9$ mm³, respectivamente, media \pm etm, $P < 0,01$). Los efectos inhibidores de mAb de ABCB5 también eran estadísticamente significativos cuando los subconjuntos de tumores de xenoinjerto de melanoma derivados de paciente recientes se analizaron independientemente, con anulación del crecimiento tumoral significativo observado en ratones tratados con mAb de control de isotipo o grupos sin tratar ($P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente) que inhibían de forma significativa el TV medio en comparación con el determinado ya sea en ratones tratados con mAb de control o sin tratar (ratones tratados con mAb anti-ABCB5 ($n = 13$ ratones) con respecto a ratones tratados con mAb de control ($n = 12$ ratones) o con respecto a ratones sin tratar ($n = 12$ ratones): $29,6 \pm 9,2$ con respecto a $289,2 \pm 91,8$ mm³, $P < 0,05$, o con respecto a $222,9 \pm 57,5$ mm³, respectivamente, media \pm etm, $P < 0,001$). El tratamiento con mAb de control –no mostró efectos significativos en el crecimiento del tumor ni en el volumen del tumor en comparación con ningún tratamiento en ninguno de los grupos analizados. Los animales se sacrificaron después del intervalo de tratamiento cuando era necesario de acuerdo con el protocolo animal experimental aplicable debido a la carga tumoral y la patología en los grupos de control tumoral derivados de paciente (TV máximo medido: 971,5 mm³).

El análisis inmunohistoquímico de xenoinjertos de melanoma derivados de paciente tratados con mAb anti-ABCB5 reveló solamente pequeños focos de expresión de ABCB5 (en conjunto <1 % de las células) corresponde a mAb anti-ABCB5 unido *in vivo* en una sección adyacente. Una sección adyacente adicional tenida para CD11b desveló infiltración de macrófagos que corresponde a regiones de localización de mAb anti-ABCB5, que normalmente rodean a las zonas de degeneración y necrosis celular. Por el contrario, los xenoinjertos tratados con de mAb de control revelaron un 10-15 % de células creativas para ABCB5, el mAb anti-Ig secundario falló en la localización de las secciones respectivas en una sección adyacente pero detectó regiones de inmunoglobulina de murino intravascular, y los macrófagos CD11b+ fracasaron en la infiltración del tejido tumoral. Algunos efectos similares se observaron en xenoinjertos de melanoma derivados de línea celular, con aumento de la necrosis tumoral en animales tratados con mAb anti-ABCB5 con respecto a animales tratados con mAb de control de isotipo (30-40 % con respecto a < 5 % de células de necróticas, respectivamente). Estos hallazgos apoyan adicionalmente la idea de que la población minoritaria enriquecida con MMIC y definida por ABCB5 es necesaria para la tumorigenicidad.

Se realizó la caracterización de xenoinjertos de melanoma G3361 en ratones atímicos Balb/c. Las regiones de ABCB5⁺ se segregaron con áreas sin melanizar, mientras que las regiones de ABCB5 se correlacionan correcciones que muestran melanización con partículas de color marrón-negro. La inmunohistoquímica de un xenoinjerto de melanoma tratado con mAb anti-ABCB5 y teñido con mAb anti-ABCB5, Ab anti-Ig secundario o mAb CD11b reveló resultados coherentes con los que se han descrito anteriormente. Al igual que en xenoinjertos derivados de paciente primarios, el análisis inmunohistoquímico de secciones de tumor adyacentes reveló que el mAb anti-ABCB5 administrado de forma sistémica se unía a las regiones de tumor ABCB5⁺, que también se correlacionan con la

infiltración de células CD11b⁺. También se detectaron zonas raras de expresión de ABCB5 en las que el anticuerpo administrado *in vivo* fracasaba en la localización y en las que las células positivas para CD11b fracasaban en la infiltración.

5 Ejemplo 9

Secuenciación del Anticuerpo 3C1 1D12: El ARN total se extrajo de los sedimentos usando el protocolo de extracción de ARN en las instalaciones de Fusion Antibodies Ltd. Se creó ADNc a partir del ARN mediante transcripción inversa con un cebador de oligo(dT). Las reacciones de PCR que usan cebadores de dominio variable para amplificar la región variable (VR) de cadena pesada (HC) y las regiones VR de cadena ligera (LC) del ADN del anticuerpo monoclonal proporcionaron bandas que se muestran en la Figura 7. Los productos de PCR de VR tanto de HC como de LC se coronaron en el vector pCR2.1 de secuenciación de Invitrogen y se transformaron en células TOP10. Los clones positivos para la cadena pesada y ligera se seleccionaron para análisis de secuenciación. Se obtuvieron las siguientes secuencias.

15

1. Secuencia de ADN de HC de longitud completa, que incluye secuencia señal (subrayada)

ATGGACTTTGGGCTGAGCTTGGTTTTCTTGTCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAG
TGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAA
GCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGAATATTACATGTATTGGGTTCGTC
 AGACTCCGGAAAAGAGGGCTGGAGTGGGTCGCCACCATTAATGATGGCGGTACTCACACC
 TACTATCCAGACAGTCTGAAGGGGCGATTACCCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAT
 CCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGATGTCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGCAA
 GAGATGATTATTACTACGGTAGTCACTTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC
 TCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC
 CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
 CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
 CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGGACCGTGCCCTC
 CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
 AAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
 CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTCTTCCCTCTCCCCCAAACCCAAAGGA
 CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
 ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCCTCACCGT
 CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
 CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTC
 TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAATGA SEC ID N°: 17

20

2. Secuencia de ADN de LC de longitud completa, que incluye secuencia señal (subrayada)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC
ACTGGTGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG
GGCCACCATCTCATACAGGGCCAGCAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATATGC
ACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAAC
CTAGAATCTGAGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCT
CAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGG
AGCTTACACGTTCCGGAGGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCA
TCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACG
CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA
CGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGTTGA SEC ID N°: 18

5 3. Secuencia de ADN de VR de HC, que incluye los CRD (subrayados)

GAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTG
AAGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACTATTACATGTATTGGGTTCCG
TCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCCGCCACCATTAATGATGGCGGTA
CCTACTATCCAGACAGTCTGAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
ATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGATGTCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGC
AAGAGATGATTATTACTACGGTAGTCACTTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
CCTCAGTCACCGTCTCCTCA SEC ID N°: 9

10 4. Secuencia de ADN de VR de LC, que incluye los CRD (subrayados)

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGG
GCCACCATCTCATACAGGGCCAGCAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCA
CTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACC
TAGAATCTGAGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTC
AACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGA
GCTTACACGTTCCGGAGGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG SEC ID N°: 10

15 5. Secuencia de Aminoácidos de VR de HC, que incluye Regiones Marco Conservadas (F1, F2, F3, y F4) y los CRD (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) tal como se indica. Las regiones marco conservada y CDR se determinan de acuerdo con la nomenclatura de Kabat (E. A. Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, 1991, NIH).

HC-F1 CDR-H1
 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS DYMY

HC-F2 CDR-H2 HC-F3
 WVRQTPEKRLEWVA TINDGGHTY YPDSLKGRFTISRDNAKNILYLQMSL

. CDR-H3 HC-F4
 MSEDAMYYCAR DDYYGSHFDAMDY WGQTSVTVSS SEC ID N°: 1

20

Los inventores también van a desarrollar y usar mediada la administración específica de células diana, mediada por anticuerpo ABCB5 de ARNsi a oncogenes específicos como una estrategia para inhibir de forma selectiva las poblaciones de células madre de tumor de melanoma ABCB5⁺ *in vivo*. Aunque hasta hace poco la administración de ARN de interferencia pequeños (ARNsi) en las células ha sido un obstáculo fundamental para su aplicación terapéutica *in vivo*, un nuevo enfoque que implica a proteínas de fusión de anticuerpo/protamina como vehículos de administración de ARNsi, recientemente se ha demostrado su eficacia en la administración sistémica, de ARNsi específico de tipo celular a los tumores de melanoma en modelos animales experimentales *in vivo*, y se ha demostrado que es eficaz para la inhibición *in vivo* del crecimiento del melanoma cuando los ARNsi dirigidos a MYC, MDM2 y VEGF eran dirigidos por anticuerpo para un receptor modelo expresado en células de melanoma murino B16. Este enfoque se aprovecha de las propiedades de unión a ácidos nucleicos de la protamina, que normalmente nuclea el ADN en el esperma, para unirse a ARNsi de diversas especificidades y administrarlos a las células que llevan un marcador específico de la superficie celular cuando la protamina se fusiona con fragmentos de anticuerpo Fab o sFv se dirige específicamente a tal marcador. Con el fin de usar esta estrategia para dirigir las células madre de melanoma que expresan ABCB5, los inventores prepararán una proteína de fusión recombinante de sFv de 3C2-1D12 anti-ABCB5/protamina (sFv-P de ABCB5), por fusión del gen de sFv de 3C2-1D12 anti-ABCB5 con el ADN de la protamina, usando el método de PCR de extensión corte y empalme-solapamiento. La proteína de fusión recombinante sFv-P de ABCB5 se expresará y purificará tal como se ha descrito anteriormente. El sFv-P de ABCB5 se usará inicialmente para administrar el ARNsi dirigido a MYC, ya que la regulación negativa de MYC dirigida por genes inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* no solamente en melanoma murino B16, sino también en ratones portadores de xenoinjertos de melanoma humano establecidos, lo que conduce a una intensa apoptosis de células tumorales a través de la inducción de p53 y la inhibición de proteínas Bcl-2. Los inventores ya han encontrado que MYC se expresa de forma coherente en subpoblaciones de melanoma humano ABCB5⁺. Además, la expresión genética de MYC humano se puede inhibir de forma eficaz mediante enfoques de ARNi, y los oligonucleótidos de ARNsi que se dirigen a MYC validados en estos estudios están disponibles en el mercado en Dharmacon, Inc. (Chicago, IL.). En los estudios propuestos, la capacidad de unión a sFv-P de ABCB5 para el ARNsi de MYC, la administración de células diana de ARNsi de MYC mediada por sFv-P de ABCB5 y la inhibición del gen de MYC resultante y el bloqueo de la proliferación de células tumorales mediado por sFv-P de ABCB5/ARNsi de MYC se examinará en primer lugar *in vitro* en cultivos de melanoma G3361 y A375 humanos exactamente tal como se ha descrito anteriormente.

El protocolo de estudio *in vivo* para la dirección de células madre de melanoma ABCB5⁺ usará modelos de xenoinjerto de tumor de ser humano a ratón usando tanto ratones NOD-SCID, así como ratones quiméricos Rag2^{-/-}/quiméricos de piel humana como receptores de xenoinjertos de melanoma humano ya sea a partir de líneas celulares establecidas o recién aisladas de pacientes humanos, exactamente como ya se ha descrito anteriormente. En una primera serie de experimentos encaminados a evaluar los efectos de las inmunotoxinas (mAb de ABCB5/gelonina o sFv/gelonina) o de ARNsi de ABCB5 sFv-P/MYC al comienzo del tumor, se administrarán inmunotoxinas (mAb de ABCB5/gelonina o sFv/gelonina o controles) con 0,25 ml de PBS estéril a través de inyección en la vena de la cola, y sFv-P de ABCB5 que forma complejo con ARNsi MYC o controles en los días 0, 1 y 3 después del implante del tumor a través de inyección en la arena de la cola (80 µg de ARNsi con un volumen de inyección de 100 µl a una relación molar de sFv-P de ABCB5/ARNsi total de 1:6) a receptores murinos de xenoinjertos de células de melanoma humano clasificados al azar en el día 0 después del xenotrasplante en el tratamiento siguiente y grupos de control (n = 10 animales por replicado para cada línea celular de melanoma cell y para cada muestra de ensayo de célula tumoral recién aislada a partir de cada n = 10 melanomas primarios y n = 10 metástasis de melanoma, xenoinjertados s.c. a ratones NOD-SCID o por vía intradérmica a piel humana/ ratones Rag2^{-/-} quimera): 1) 500 µg/ratón de mAb de ABCB5/gelonina i.v. q.o.d. comenzando en el día 0; 2) 500 µg/ratón de mAb/gelonina de control de isotipo i.v. q.o.d. comenzando en el día 0; 3) 500 µg/ratón de sFv de ABCB5/gelonina i.v. q.o.d. comenzando en el día 0; 4) 500 µg/ratón de sFv/gelonina de control i.v. q.o.d. comenzando en el día 0; 5) ARNsi de sFv-P de ABCB5/MYC i.v. en los días 0, 1 y 3; 6) sFv-P de ABCB5/ARNsi de control i.v. en los días 0, 1 y 3; 7) sFv-P de ABCB5 i.v. en los días 0, 1 y 3. El protocolo de tratamiento se resume en la Tabla 2:

Tabla 2

Grupo	Nº de ratones	Tratamiento
1	10	500 µg/ratón de mAb de ABCB5/gelonina i.v. q.o.d. comenzando en el día 0
2	10	500 µg/ratón de mAb/gelonina de control de isotipo i.v. q.o.d. comenzando en el día 0
3	10	500 µg/ratón de sFv de ABCB5/gelonina i.v. q.o.d. comenzando en el día 0
4	10	500 µg/ratón de sFv/gelonina de control i.v. q.o.d. comenzando en el día 0
5	10	ARNsi de sFv-P de ABCB5/MYC i.v. en los días 0, 1 y 3
6	10	ARNsi de sFv-P de ABCB5/control i.v. en los días 0, 1 y 3
7	10	sFv-P de ABCB5 i.v. en los días 0, 1 y 3

En un segundo conjunto de experimentos dirigidos a la evaluación de los efectos de inmunotoxinas (mAb de ABCB5/gelonina o sFv/gelonina) o de ARNsi de sFv-P de ABCB5/MYC en la evolución del tumor de tumores establecidos, se clasificarán al azar receptores murinos de xenoinjertos de células de melanoma humano en el día 7 después del xenotrasplante (cuando los tumores se establecen) en los grupos de tratamiento y de control que se resumen en la Tabla 7 (n = 10 animales por replicado para cada línea celular de melanoma y para cada muestra que el ensayo de célula tumoral recién aislada de cada n = 10 melanomas primarios y n = 10 metástasis de melanoma, xenoinjertados s.c. a ratones NOD-SCID o por vía intradérmica la piel humana / ratones Rag2-/- quimera):

Tabla 3

Grupo	Nº de ratones	Tratamiento
8	10	500 µg/ratón de mAb de ABCB5/gelonina i.v. q.o.d. comenzando en el día 7
9	10	500 µg/ratón de mAb/gelonina de control de isotipo i.v. q.o.d. comenzando en el día 7
10	10	500 µg/ratón de sFv de ABCB5/gelonina i.v. q.o.d. comenzando en el día 7
11	10	500 µg/ratón de sFv/gelonina de control i.v. q.o.d. comenzando en el día 7
12	10	ARNsi de sFv-P de ABCB5/MYC i.v. en los días 7, 8 y 10
13	10	ARNsi de sFv-P de ABCB5/control i.v. en los días 7, 8 y 10
14	10	sFv-P de ABCB5 i.v. en los días 7, 8 y 10

La formación/crecimiento clínico del tumor se someterá al ensayo diariamente como un transcurso del tiempo mediante la determinación del volumen del tumor (TV) de acuerdo con la fórmula establecida $[TV (mm^3) = \pi / 6 \times 0,5 \times longitud \times (ancho)^2]$ para la duración del experimento (45 días). Se evaluarán diferencias estadísticamente significativas en la formación del tumor como una función del régimen de tratamiento aplicado usando el ensayo Exacto de Fisher. Las diferencias en los volúmenes del tumor entre grupos experimentales se determinarán usando ANOVA no paramétrico. Los valores de P de dos colas < 0,05 se considerarán estadísticamente significativos. Los análisis de inmunofluorescencia y de inmunohistoquímica para cada tumor xenoinjerto de tumor trasplantados diseccionado de animales de todos los grupos de tratamiento sacrificados inicialmente en el día 45 del experimento (sacrificio secuenciales [por ejemplo, en los días 10, 20, 30, y 45] se realizarán basándose en los hallazgos de 45 días, y además del examen de tumores primarios, se hará necropsia a los animales sacrificados, se evaluarán todas las metástasis, y todos los tejidos se evaluarán patológicamente para evidencia de toxicidad mediada por el régimen de tratamiento aplicado). La expresión de ABCB5 y la coexpresión de ABCB5 con CD133 se evaluarán mediante doble tinción HRP/AP-inmunoenzimática secuencial de secciones de xenoinjerto de melanoma congelado tal como se ha descrito anteriormente. Se analizarán secciones de tumor mediante microscopía de campo brillante, y los porcentajes medios de las células con tinción positiva para cada marcado se clasificarán de forma semicuantitativa (sin positividad: -; positividad < 10 %: +; positividad de un 10-50 %: ++; positividad > 50 %: +++) basándose en el recuento celular en tres campos de microscopía (aumento de 400x) para cada condición de tinción tal como se ha descrito anteriormente. Usando un microscopio de fluorescencia y filtros separados para cada fluorocromo, se hará el recuento de células positivas para RFP (origen en ABCB5⁺) y células positivas para GFP (origen en ABCB5⁻), (100 células/muestra) y se calcularán las proporciones de células RFP/GFP dentro de cada tumor. Las relaciones medias derivadas de animales por replicado sometidos a cada régimen de tratamiento se compararán de forma estadística usando ANOVA no paramétrico. Para evaluar la eficacia de estrategias que se dirigen a ABCB5⁺, se identificarán células de melanoma apoptóticas que crecen en la hipodermis murina, xenoinjertos de piel humana, y en sitios de metástasis de acuerdo con criterios establecidos usados para microscopía de luz y se confirmarán mediante el ensayo de TUNEL. Los inventores también identificarán sistemáticamente de forma inmunohistoquímica la expresión de proteínas relevante para las rutas apoptóticas, que incluyen Bax, Bcl-2, y Bcl-XL. Por último, estos resultados se correlacionarán con la identificación sistemática para marcadores relacionados con la proliferación celular (MIB-1, PCNA, y ciclina D1/D3). Las células positivas se enumerarán de forma manual sobre perfiles transversales, y mediante el uso de programas de formación de imágenes asistidos por ordenador disponibles en el laboratorio de co-PI (GFM) que deberían aumentar de forma significativa la eficacia de la cuantificación.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene melanoma, comprende un anticuerpo anti-
 5 ABCB5 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene al menos una región humana, el anticuerpo anti-
 ABCB5 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende 1) un dominio variable de cadena pesada de
 inmunoglobulina, en el que: (i) CDR1-H1 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3; (ii) CDR2-
 H2 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; y (iii) la secuencia de CDR3-H3 comprende una
 10 secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5, y comprende adicionalmente 2) un dominio variable de cadena ligera
 de inmunoglobulina, en el que: (i) CDR1-L1 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6; (ii)
 CDR2-L2 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7; y (iii) la secuencia de CDR3-L3 comprende
 una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8.
2. Uso de una composición para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene
 15 melanoma, composición que comprende un anticuerpo anti-ABCB5 o fragmento de unión a antígeno del mismo,
 que tiene al menos una región humana, el anticuerpo anti-ABCB5 o fragmento de unión a antígeno del mismo
 comprende 1) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, en el que: (i) CDR1-H1 comprende una
 secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3; (ii) CDR2-H2 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID
 N°: 4; y (iii) la secuencia de CDR3-H3 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5, y comprende
 20 adicionalmente 2) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en el que: (i) CDR1-L1 comprende una
 secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6; (ii) CDR2-L2 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID
 N°: 7; y (iii) la secuencia de CDR3-L3 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8.
3. La composición de la reivindicación 1 o uso de la reivindicación 2, en las que el anticuerpo es un Fv
 25 monocatenario, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo sintético.
4. La composición de la reivindicación 1 o uso de la reivindicación 2, que comprende al menos al menos dos
 dominios variables de anticuerpo que comprenden: (a) el dominio variable de anticuerpo de cadena pesada de la
 SEC ID N°: 1; y (b) el dominio variable de anticuerpo de cadena ligera de la SEC ID N°: 2.
- 30 5. La composición de la reivindicación 1 o uso de la reivindicación 2 en las que el anticuerpo es un anticuerpo
 aislado totalmente humano.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o uso de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente un
 35 dominio de dimerización unido a la región C-terminal de un dominio variable de polipéptido de cadena pesada.
7. La composición de la reivindicación 1 o uso de la reivindicación 2, en las que el anticuerpo anti-ABCB5 o
 fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo quimérico que comprende un dominio variable que se
 une de forma específica a ABCB5 y un dominio constante, en el que el dominio variable y el dominio constante son
 40 de especies diferentes.

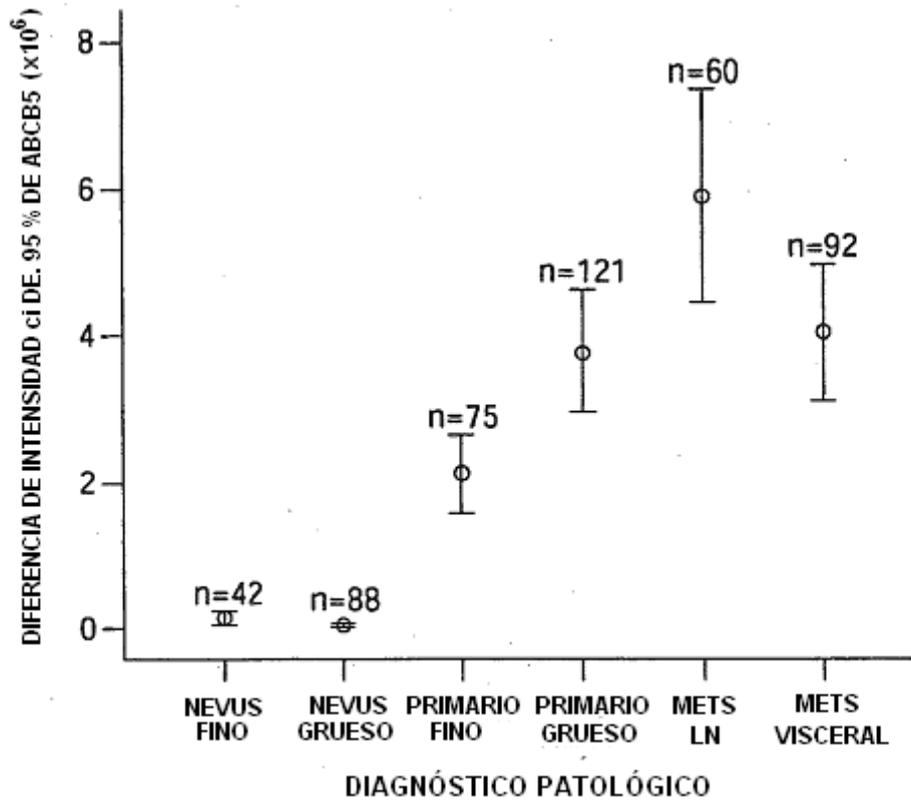


Fig. 1A

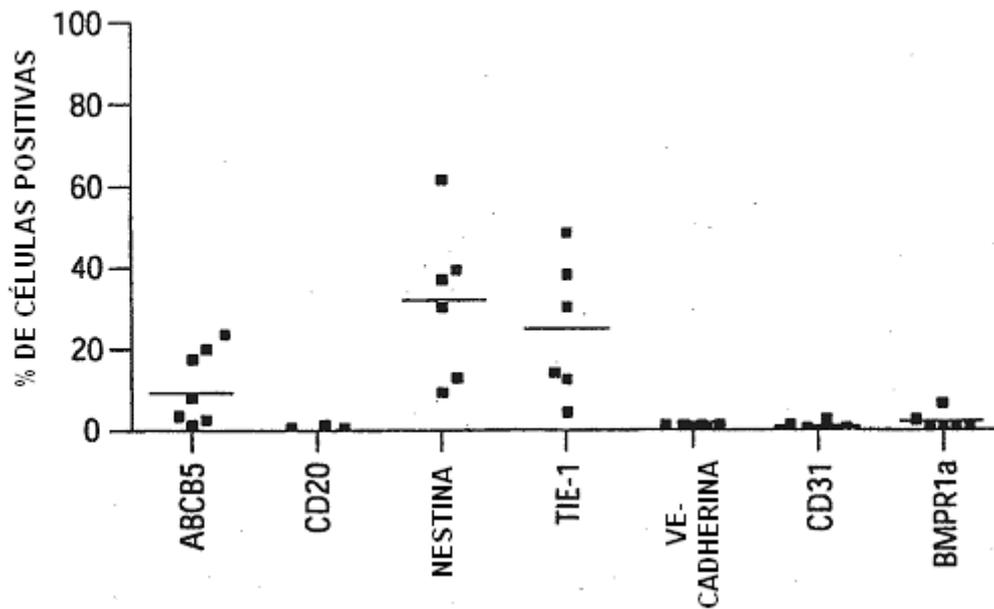


Fig. 1B

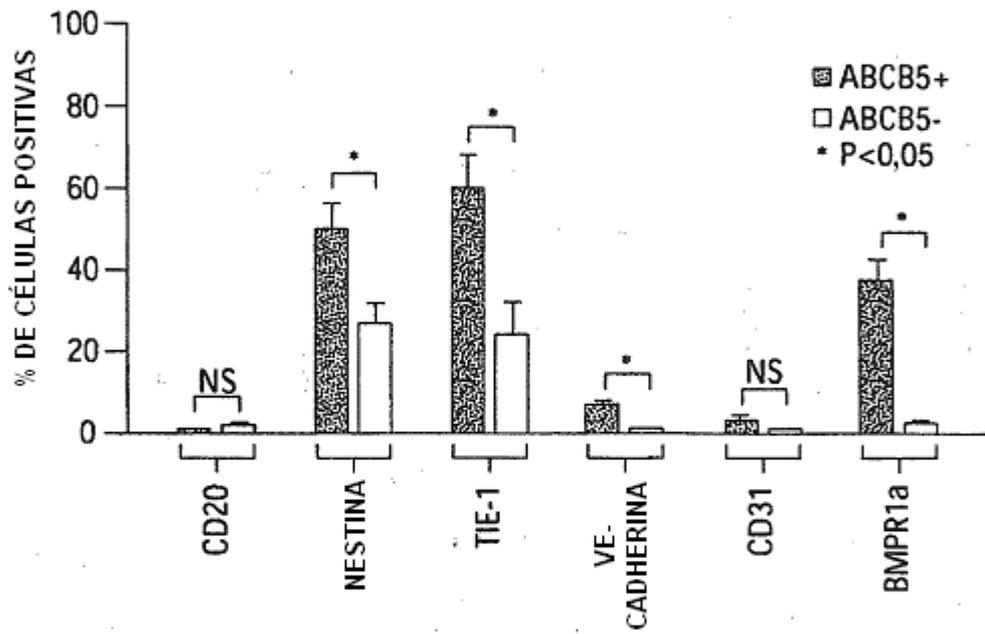


Fig. 1C

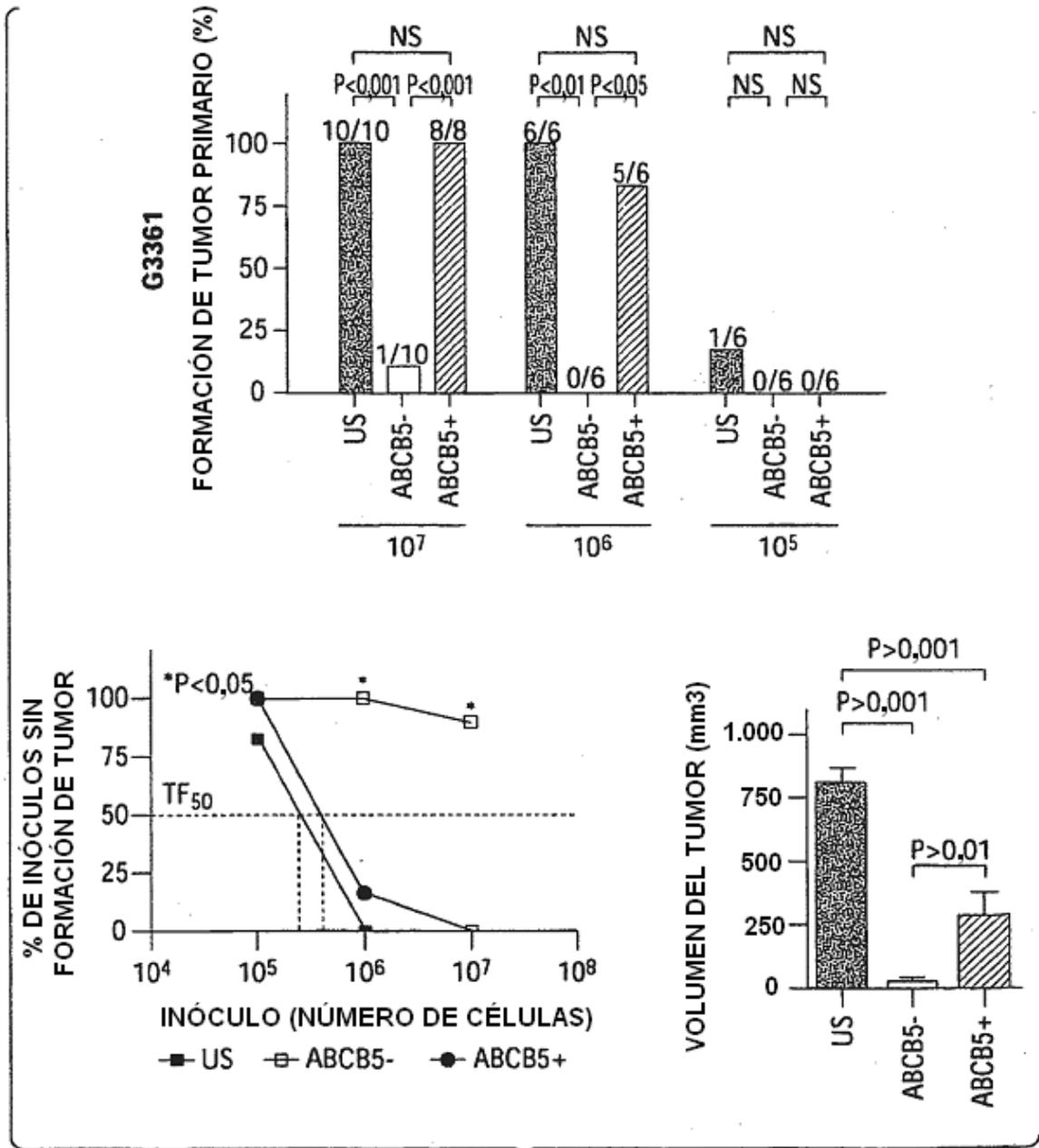


Fig. 2A

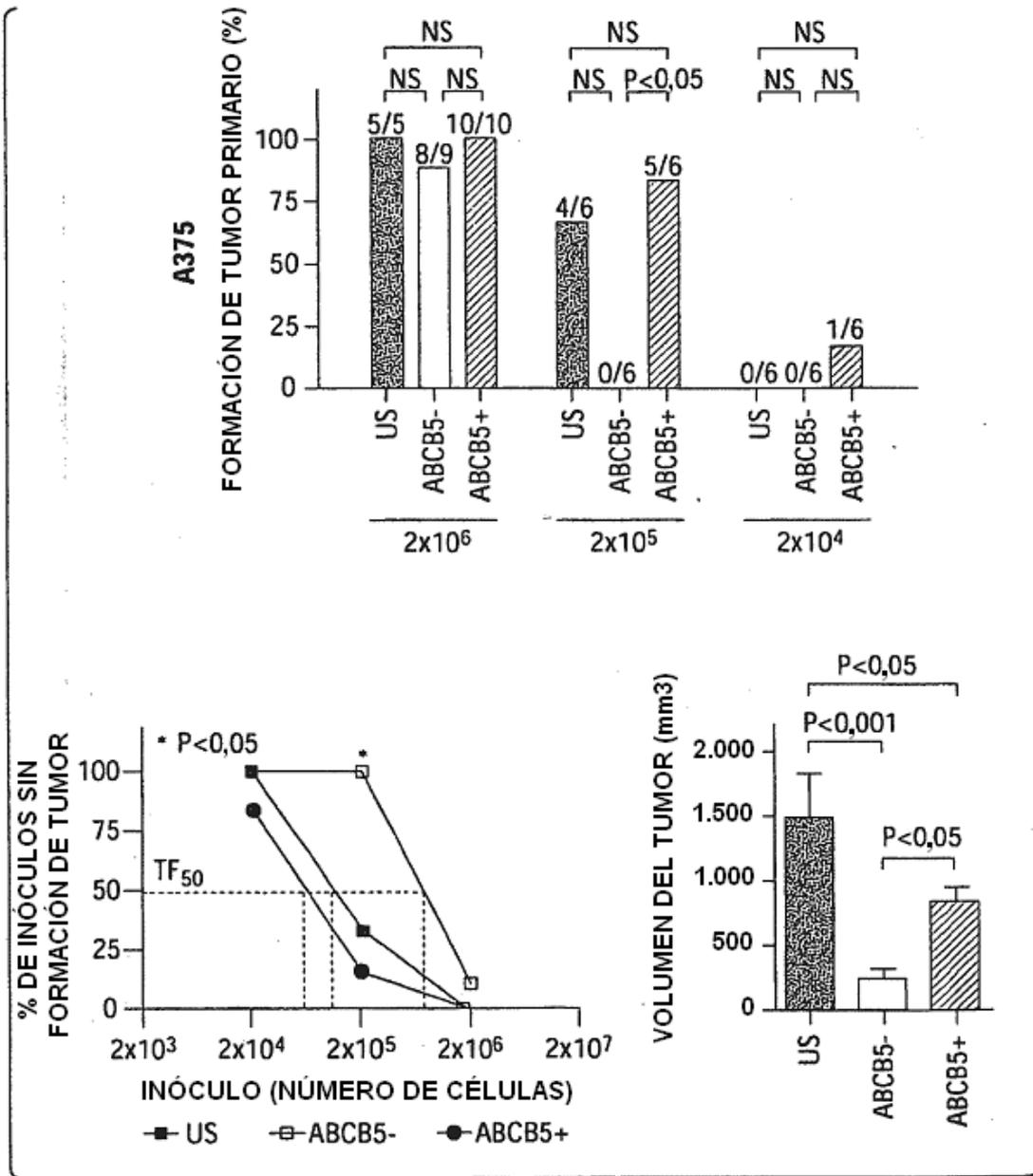


Fig. 2B

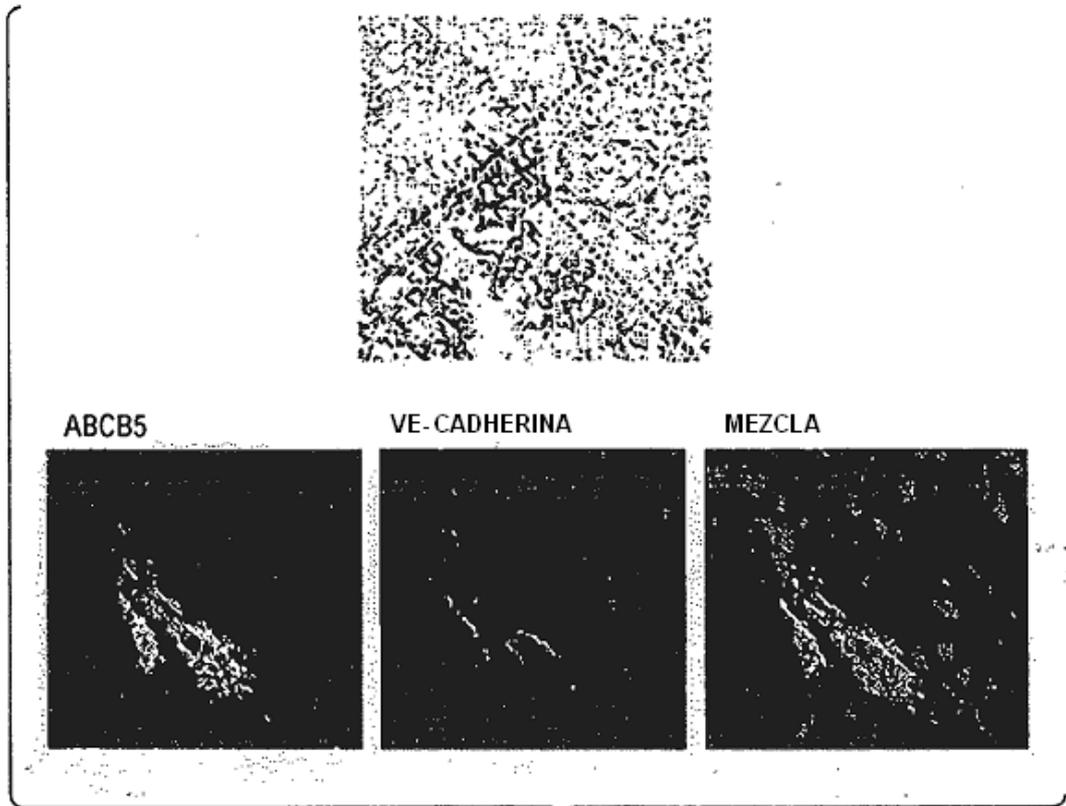


Fig. 2C

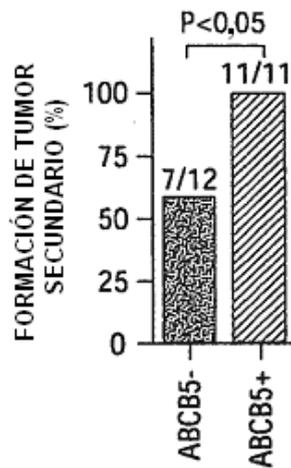


Fig. 2D

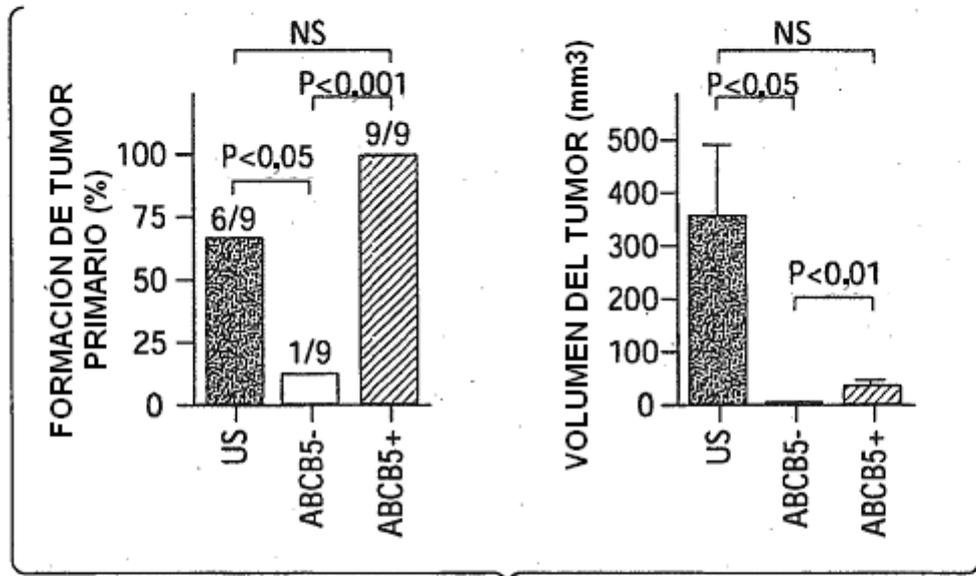


Fig. 2E

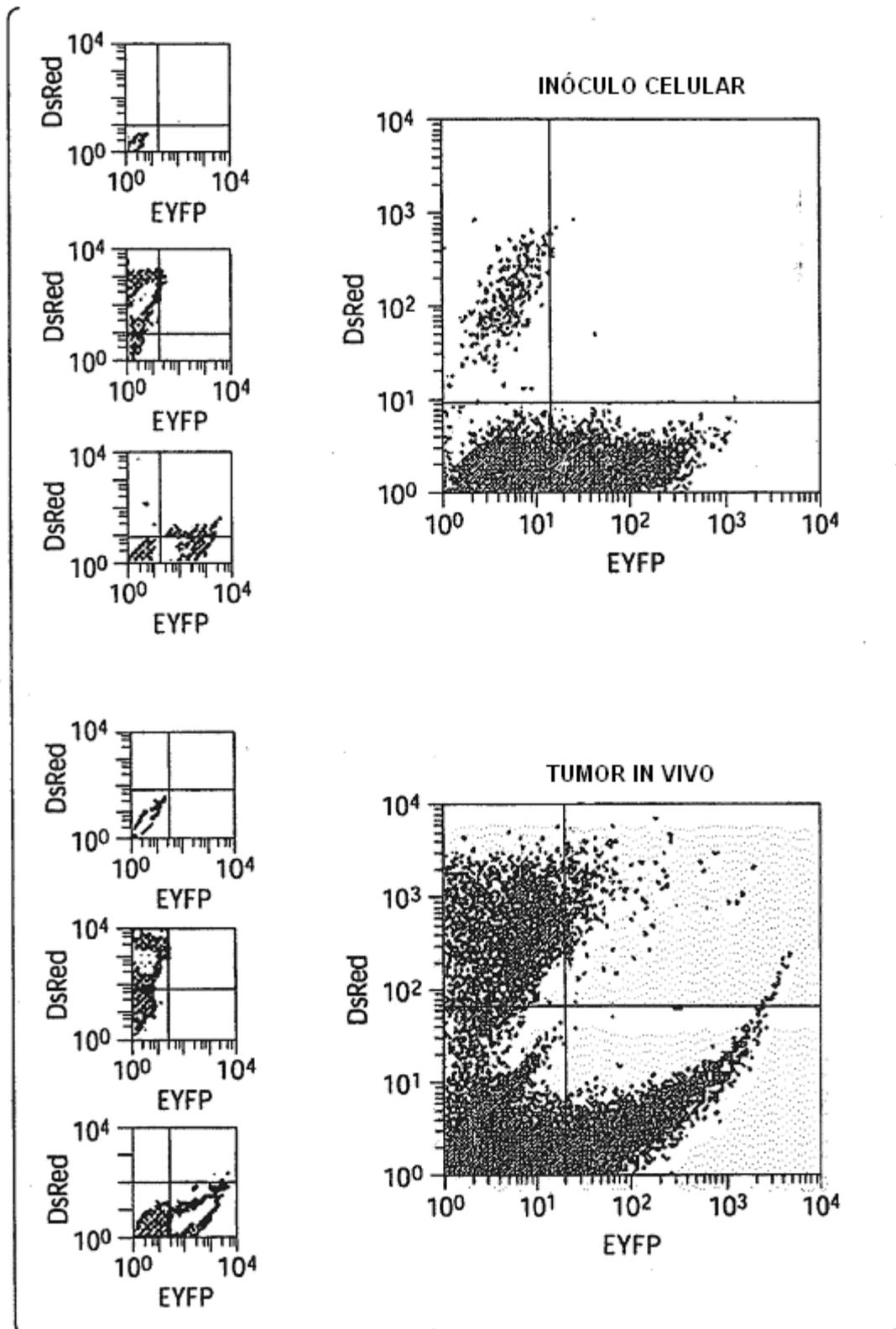


Fig. 3A

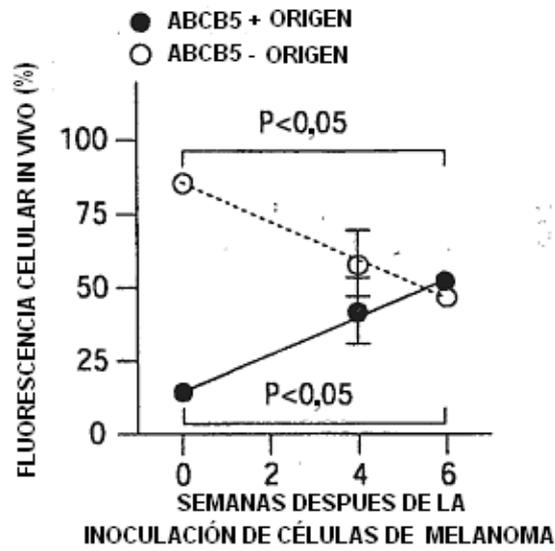


Fig. 3B

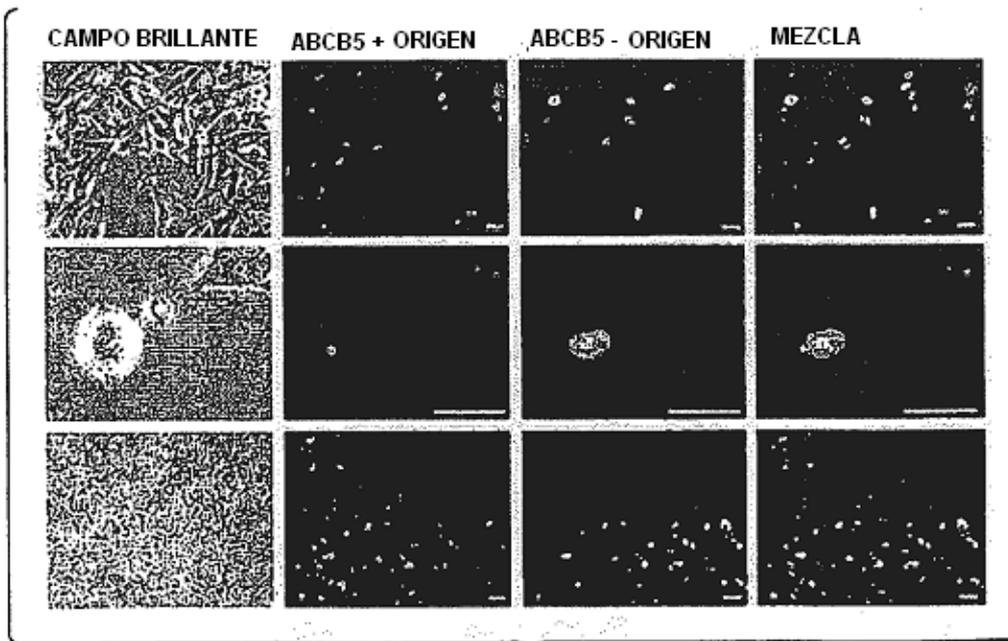


Fig. 3C

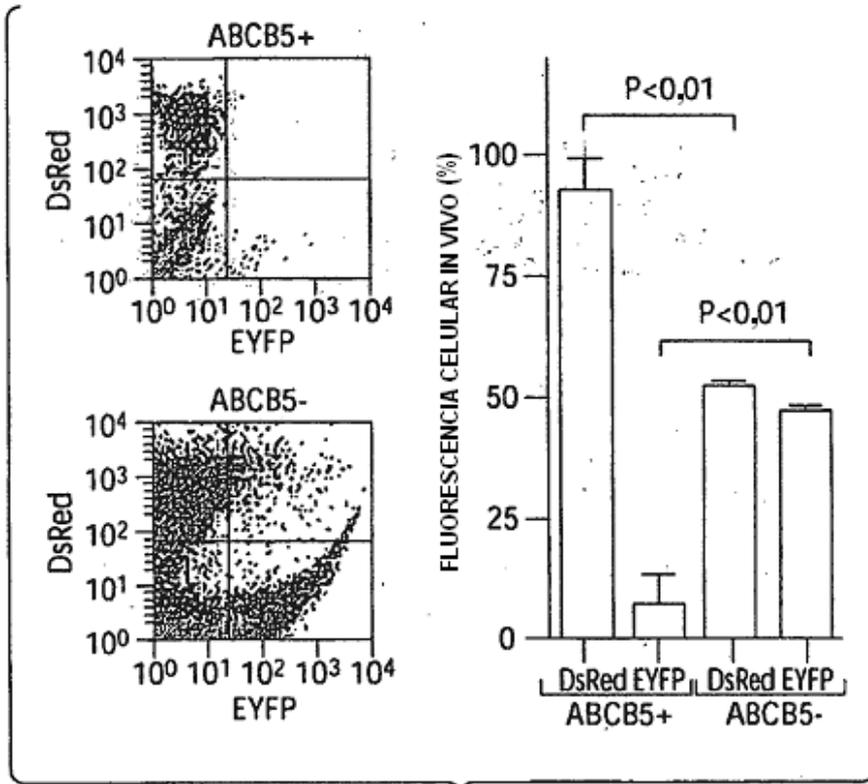


Fig. 3D

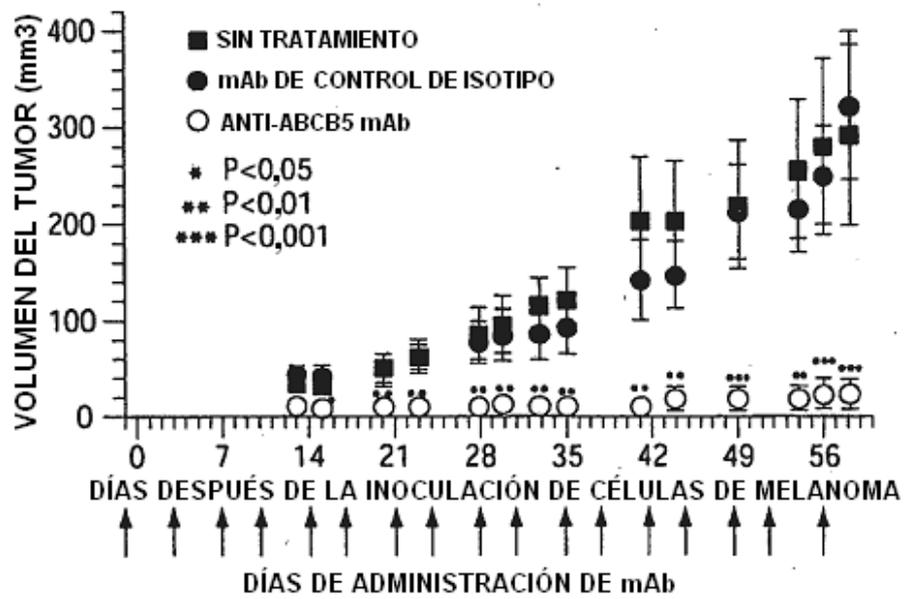


Fig. 4A

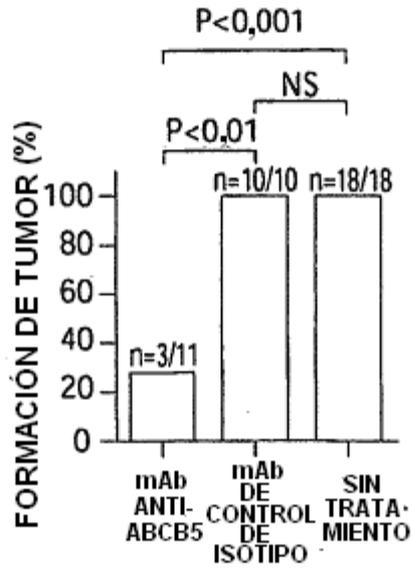


Fig. 4B

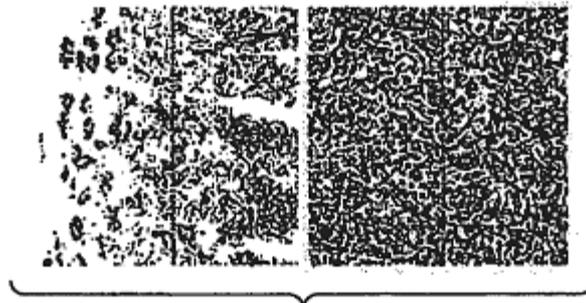


Fig. 4C

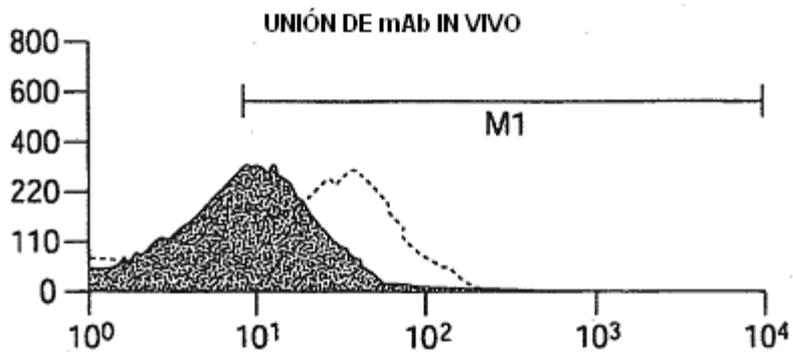


Fig. 4D

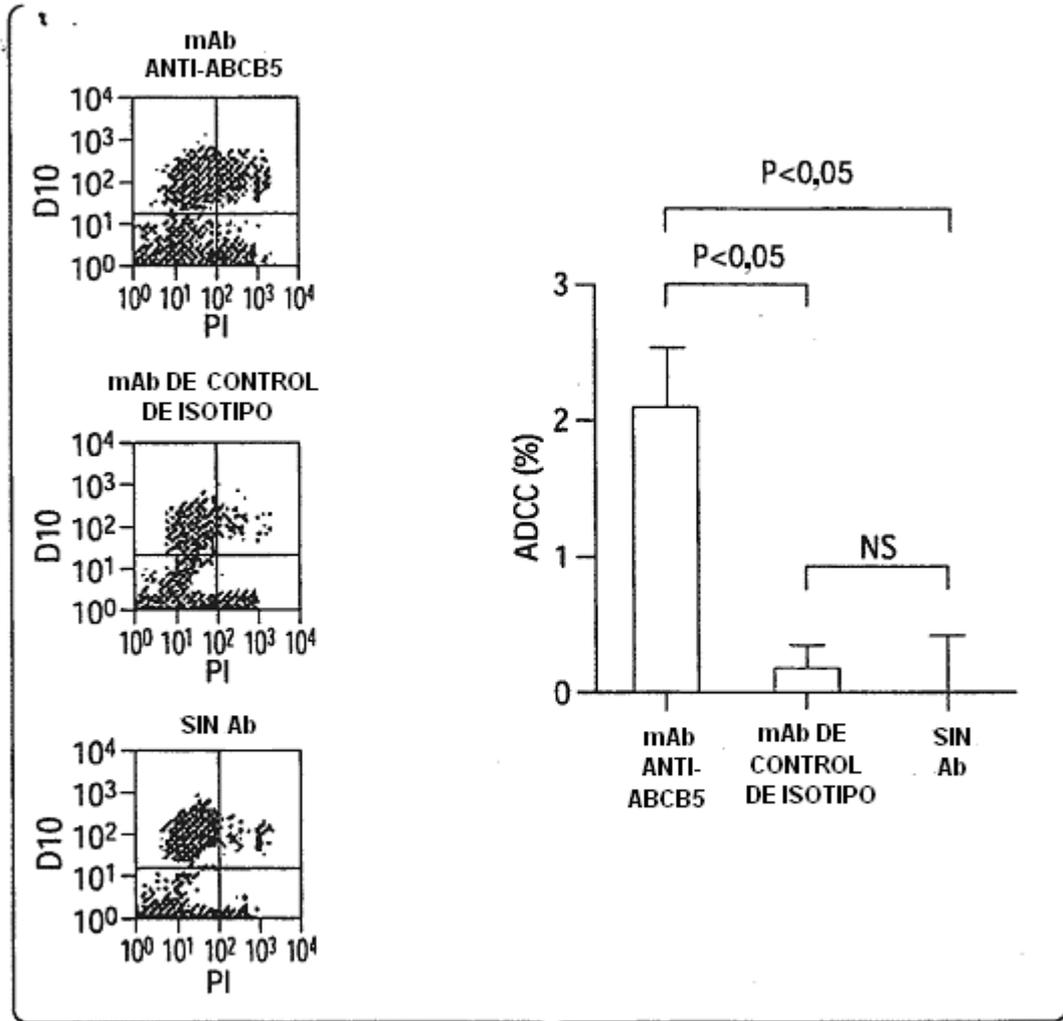


Fig. 4E

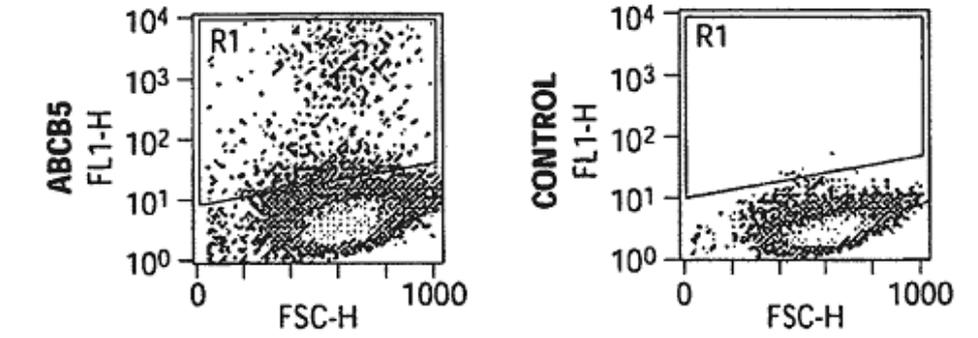


Fig. 5A

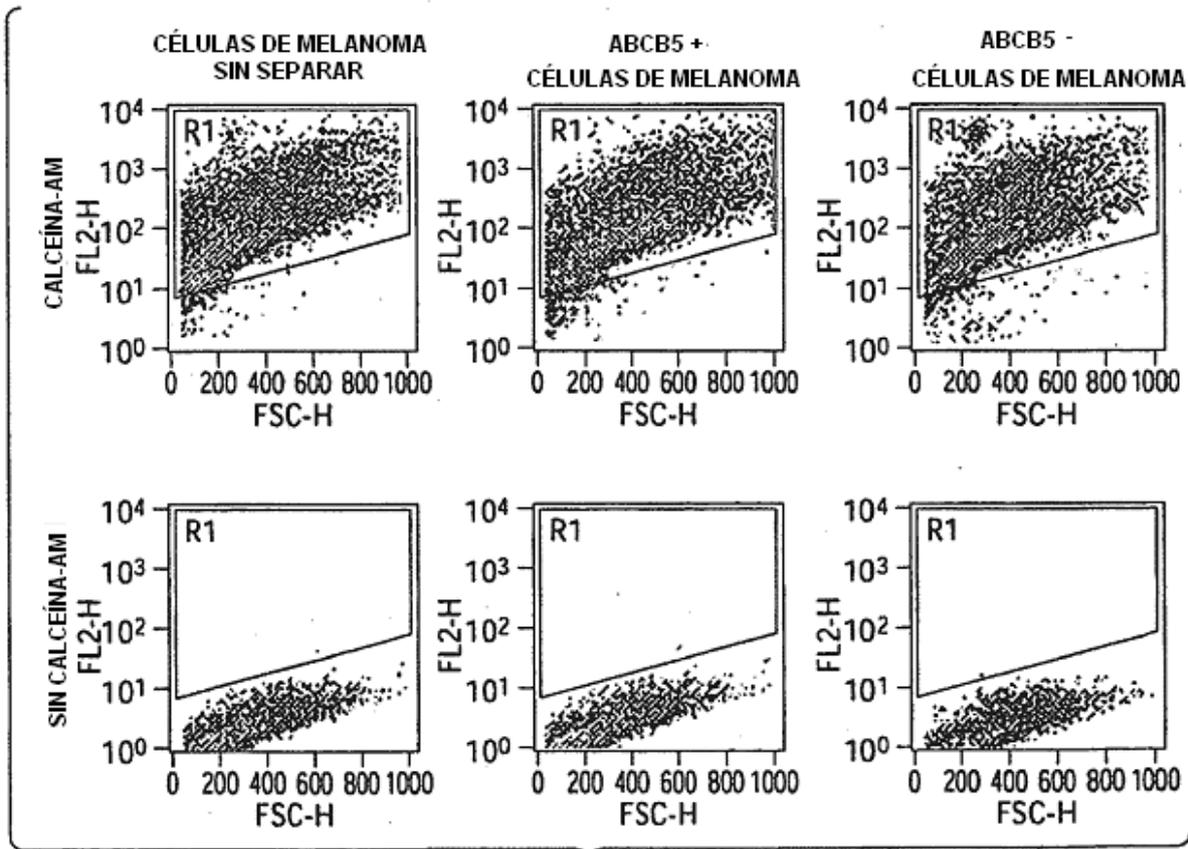


Fig. 5B

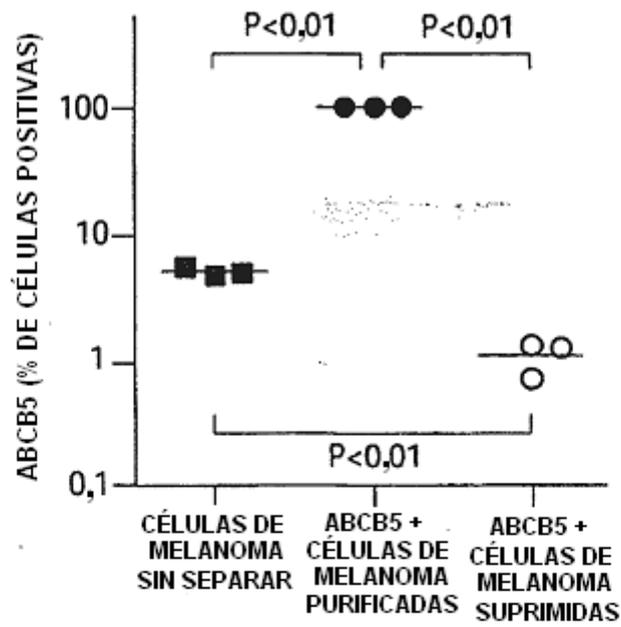


Fig. 5C

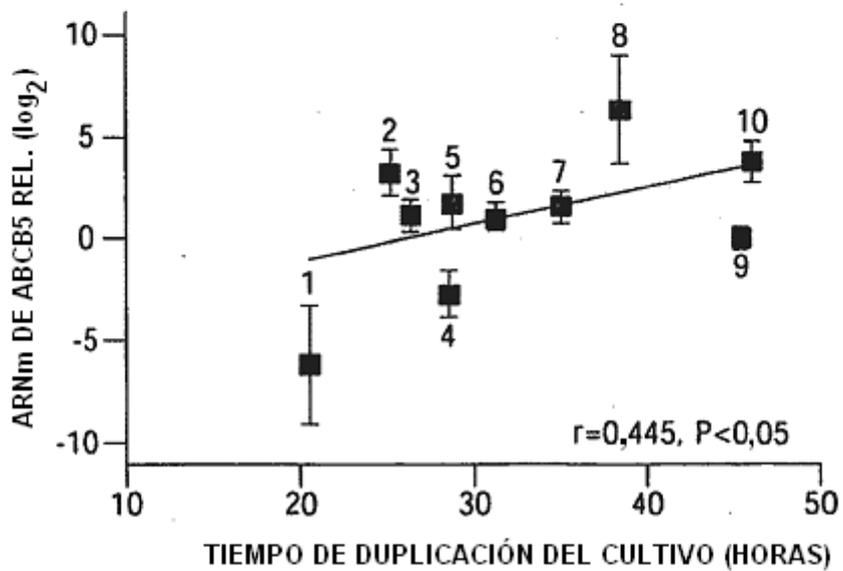


Fig. 6

LC-F1	CDR-L1	LC-F2
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISY	RASKSVSTSGYSYMH	WNQQKPGQPPRLLIY
CDR-L2	LC-F3	CDR-L3
LVSNLES	EVPARFSGSGSDTFTLN	HPVEEDAATYYC QHIRELTR
LC-F4		
SEGGTKLEIKR		

SE INDICAN LAS CUATRO REGIONES DE MARCO CONSERVADAS F1, F2, F3, Y F4 ASÍ COMO LAS TRES REGIONES QUE DETERMINAN LA COMPLEMENTARIEDAD, CDR-L1, CDR-L2 Y CDR-L3.

Fig. 10

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGG
 GCCACCATCTCATACAGGGCCAGCAAAAGTGTACAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCA
 CTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACC
 TAGAATCTGAGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTC
 AACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGA
GCTTACACGTTCGGAGGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

LAS SECUENCIAS DE CDR ESTÁN SUBRAYADAS

Fig. 11

ATGGACTTTGGGCTGAGCTTGGTTTTCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAG
TGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAA
GCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGTATTGGGTTTCGTC
AGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTGCCACCATTAATGATGGCGTACTCACACC
TACTATCCAGACAGTCTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAT
CCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGATGTCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGCAA
GAGATGATTATTACTACGGTAGTCACTTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC
TCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC
CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
CCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCCAAACCCAAGGA
CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCC
TCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAATGA

Fig. 12

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTA CTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC
ACTGGTGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG
GGCCACCATCTCATA CAGGGCCAGCAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGC
ACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAAC
CTAGAATCTGAGGTCCCTGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCT
CAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGG
AGCTTACACGTTCCGAGGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCA
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGT
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACG
CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA
CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGTGA

Fig. 13