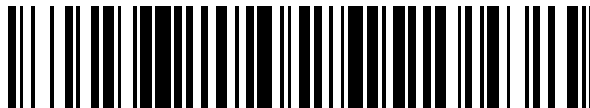


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 270**

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 13163810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2644205**

54 Título: **Fijación como objetivo de ABCB5 para la terapia del 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:

**24.10.2018**

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 2 687 270 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**

Fijación como objetivo de ABCB5 para la terapia del cáncer

Investigación federalmente patrocinada

5 Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo Concesión NIH N° 1R01CA113796-01A1. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

10 El melanoma maligno humano es un cáncer altamente quimiorrefractario. Actualmente no hay muchas opciones de tratamiento efectivas. El melanoma maligno de la piel es muy frecuente en los Estados Unidos, con 1 de cada 63 hombres y mujeres afectados durante su vida. De ellos, el 11% se diagnostica después de que el cáncer se haya diseminado a los ganglios linfáticos regionales o directamente más allá del sitio primario y el 3% después de que el cáncer ya se haya metastasizado (fase distante), con tasas de supervivencia relativa correspondiente a 5 años de 63,8% y 16,0%.

Sumario de la invención

15 La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las células madre tumorales ABCB5+ quimiorresistentes contribuyen al desarrollo de cánceres tales como el melanoma y que estas células pueden ser fijadas como objetivo para tratar el cáncer. La fijación como objetivo de ABCB5 puede emplearse como un enfoque terapéutico independiente para la enfermedad diseminada, o como una terapia adyuvante para sensibilizar las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos, especialmente en aquellos pacientes con enfermedad metastásica refractaria en la actualidad. Una ventaja de los enfoques terapéuticos que fijan como objetivo ABCB5 es  
20 que están dirigidos a las células madre tumorigénicas, mientras que las terapias convencionales fijan como objetivo únicamente a la población global de células tumorales.

25 En algunos aspectos, la invención se refiere a un método para suministrar un agente terapéutico a un compartimento intracelular de una célula, al poner en contacto una célula con un anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas que se une selectivamente a ABCB5 conjugado con un agente terapéutico.

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

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

El anticuerpo aislado está presente en una cantidad eficaz para potenciar la quimiosensibilización en un sujeto humano.

35 De acuerdo con aún otro aspecto de la invención, una composición de un anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas que se une selectivamente a ABCB5 se co-formula preferiblemente con un agente terapéutico.

40 El anticuerpo monoclonal aislado, en algunas realizaciones, está conjugado con el agente terapéutico. En otras realizaciones, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en camptotecina 9-NH2, mitoxantrona, camptotecina 7-Cl, pirazofurina, menogaril, éster de camptotecina 20, camptotecina, amsacrina, etoposide, derivado de antrapirazol, temiposido, camptotecina 11-formilo, camptotecina 10-OH, daunorrubicina, doxidoxorrubicina, doxorubicina, oxantrazool, camptotecina 11-HOME, zorubicina, uracil mostaza, piperazinadiona, hepsulfam, melfalán, bisantreno, trietilenmelamina, espiromustina, Yoshi-864, clorambucilo, piperazina mostaza, hidroiurea, porfiromicina, mecloretamina, fluorodopan, mitomicina, citarabina (araC), dianhidrogalactitol, gemcitabina, tiotepa, N,N-dibencil-daunomicina, teroxirona y afidicolina-glicinato.

45 Se proporciona un kit según otros aspectos de la divulgación. El kit incluye un recipiente que contiene un anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas que se une selectivamente a ABCB5 e instrucciones para administrar el anticuerpo mo

noclonal aislado a un sujeto humano.

50 Se proporciona un método para tratar un sujeto de acuerdo con otros aspectos de la invención. El método implica la administración sistémica de un anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas que se une selectivamente a ABCB5 a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad efectiva para tratar el cáncer.

También se proporciona un método para tratar a un sujeto mediante la administración de una cualquiera de las composiciones que contienen un anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas que se une selectivamente a ABCB5, según se describe en esta memoria a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

- 5 El método puede implicar también administrar para tratar un sujeto de acuerdo con otros aspectos de la invención. El método implica administrar un anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas que se une selectivamente a ABCB5 y un agente quimioterapéutico, a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

10 De acuerdo con otros aspectos de la invención, se proporciona un método para tratar a un sujeto administrando sistémicamente a un sujeto que tiene cáncer en una cantidad eficaz para tratar el cáncer un anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas que se une selectivamente a ABCB5 y a un agente quimioterapéutico.

15 La invención, en otros aspectos, es un anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, la CDR3-H3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3. El péptido aislado se puede unir a ABCB5 humano. En aún otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado es totalmente humano.

El anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas, en otras realizaciones está conjugado a un marcador detectable.

20 La composición de un anticuerpo monoclonal según se define en las reivindicaciones adjuntas también puede incluir un soporte farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, es una formulación estéril.

El uso de "incluir", "que comprende" o "tener", "contener", "implicar" y variaciones de los mismos en esta memoria, pretende abarcar los artículos enumerados a continuación y sus equivalentes, así como elementos adicionales.

Breve descripción de los dibujos

25 Los dibujos adjuntos no están destinados a ser dibujados a escala. En los dibujos, cada uno de los componentes idénticos o casi idénticos que se ilustran en diversas figuras está representado por un número similar. Por motivos de claridad, no todos los componentes pueden marcarse en cada uno de los dibujos. En los dibujos:

30 La **Figura 1** es una serie de imágenes y gráficos que representan un análisis de micromatrices de tejido de progresión de melanoma para ABCB5, así como una caracterización de poblaciones de melanoma ABCB5<sup>+</sup>. La **Figura 1(a)** muestra un gráfico que ilustra un análisis por Chromavision Automated Cellular Image System, mostrando diferencias significativas en las intensidades de tinción ABCB5 para nevos melanocíticos delgados y gruesos frente a melanomas primarios finos y gruesos, frente a metástasis de ganglios linfáticos y melanoma visceral (nevos delgados o gruesos frente a melanomas primarios finos o gruesos, o frente a ganglios linfáticos o metástasis viscerales, todos los valores de  $P < 0,001$ ; melanomas primarios lentos frente a melanomas primarios gruesos  $P = 0,004$ ; melanomas primarios finos y gruesos frente a metástasis de ganglios linfáticos,  $P = 0,001$ , metástasis de ganglios linfáticos frente a metástasis viscerales,  $P = 0,025$ ). **Figuras 1(b-c)** representan varias caracterizaciones de poblaciones de melanoma ABCB5<sup>+</sup>. La **Figura 1(b)** representa un análisis de citometría de flujo de 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 expresión media). La **Figura 1(c)** muestra la expresión de CD20, Nestina, TIE-1, VE-cadherina, CD31 o BMPR1a por células de melanoma clínico de ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup> según se determina por citometría de flujo de doble color. % de células positivas (media  $\pm$  SEM) se ilustran para  $n = 3-6$  pacientes con melanoma.

35 La **Figura 2** es una serie de gráficos e imágenes que representan la tumorigenicidad *in vivo* de subconjuntos de células de melanoma ABCB5<sup>+</sup> en modelos de xenoinjerto de tumor humano a ratón. La **Figura 2(a)** (Panel izquierdo) es un gráfico que demuestra la capacidad de formación de tumor *in vivo* (%) de células de melanoma G3361 no segregado (US), ABCB5<sup>-</sup> o ABCB5<sup>+</sup> después de un xenotrasplante s.c. ( $10^7$ ,  $10^6$  o  $10^5$  células/inóculo) en ratones NOD/SCID. (Panel central) es un gráfico que muestra el % de inóculo sin formación de tumor trazado frente al número de células inoculadas para células de melanoma G3361 no segregado (US), ABCB5<sup>-</sup> o ABCB5<sup>+</sup> en ratones NOD/SCID, para la determinación de la capacidad de formación del tumor del 50% (TF<sub>50</sub>) (Panel derecho) muestra los volúmenes del tumor (media  $\pm$  SEM) de xenoinjertos de melanoma primario 8 semanas después de xenotrasplantes s.c. en ratones NOD/SCID de células de melanoma G3361 no segregado (US), ABCB5<sup>-</sup> o ABCB5<sup>+</sup> ( $10^7$ /inóculo). La **Figura 2(b)** (Panel izquierdo) es un gráfico que muestra la capacidad de formación de tumores *in vivo* (%) de células de melanoma A375 no segregado (US), ABCB5<sup>-</sup> o ABCB5<sup>+</sup> después del xenotrasplante s.c. ( $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$  o  $2 \times 10^4$  células/inóculo) en ratones NOD/SCID. (Panel central) representa el % de inóculo sin formación de tumor representado frente al número de células inoculadas para células de melanoma A375 no segregado (US), ABCB5<sup>-</sup> o ABCB5<sup>+</sup> en ratones NOD/SCID, para la determinación de la capacidad de formación del tumor del 50% (TF<sub>50</sub>) (Panel derecho) muestra los volúmenes de los tumores (media  $\pm$  SEM) de xenoinjertos de

melanoma primario 5 semanas después de xenotrasplantes s.c. en ratones NOD/SCID de células de melanoma A375 no segregado (US), ABCB5<sup>-</sup> o ABCB5<sup>+</sup> ( $2 \times 10^6$ /inóculo). La **Figura 2(c)** (Panel izquierdo) muestra la inmunohistoquímica para la expresión de ABCB5 en un xenoinjerto de células de melanoma no segregado primario representativo en ratones NOD/SCID, que ilustra tres zonas discretas delimitadas por líneas punteadas: ABCB5<sup>-</sup>/melanina negativa (parte superior izquierda del panel), ABCB5<sup>+</sup>/melanina-positivo (parte superior derecha del panel) y ABCB5<sup>+</sup>/melanina-negativa (mitad inferior del panel). El (Panel derecho) es una serie de imágenes de doble tinción de inmunofluorescencia de secciones de xenoinjerto de melanoma congelado para la co-expresión de ABCB5 (FITC) y VE-cadherina (Rojo Texas). Los núcleos se visualizan por tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, azul). La **Figura 2(d)** es un gráfico que representa la capacidad de la formación de tumor secundario (%) en ratones NOD/SCID de células ABCB5<sup>-</sup> o ABCB5<sup>+</sup> ( $10^7$ /inóculo) aisladas de tumores primarios ABCB5<sup>+</sup> derivados de células de melanoma. La **Figura 2(e)** contiene dos gráficos que representan la capacidad de formación de tumores *in vivo* (%) (panel izquierdo) y los volúmenes del tumor (media  $\pm$  SEM, panel derecho) de células de melanoma no segregadas (US), ABCB5<sup>-</sup> o ABCB5<sup>+</sup> recién derivadas del paciente ( $10^6$ /inóculo) 8 semanas después del xenotrasplante s.c. en ratones NOD/SCID.

La **Figura 3** representa el seguimiento *in vivo* de tumorigenicidad, autorrenovación y diferenciación de células de melanoma ABCB5<sup>+</sup> humanas en receptores de ratones NOD/SCID. La **Figura 3(a)** (Paneles izquierdos) muestra la citometría de flujo de dos colores (gráficos de puntos F11 (EYFP) frente a F12 (DsRed2)) de un inóculo de células tumorales que consiste en 10% de células G3361 ABCB5<sup>+</sup>/DsRed2 y 90% de células G3361 ABCB5<sup>-</sup>/EYFP antes de xenotrasplante (que se muestra en un panel grande). Los controles (mostrados en paneles pequeños) son células de melanoma humano G3361 no transfectadas (parte superior), células G3361/DsRed2 (centro) y células G3361/EYFP (parte inferior). Los (Paneles derechos) muestran la citometría de flujo de dos colores (gráficos de puntos F11 (EYFP) frente a F12 (DsRed2)) de un tumor de xenoinjerto disociado formado 6 semanas después de la inoculación de 10% de células G3361 ABCB5<sup>+</sup>/DsRed2 y 90% de células G3361 ABCB5<sup>-</sup>/EYFP (se muestran en un panel grande). Los controles (mostrados en paneles pequeños) son células de melanoma humano G3361 no transfectadas (parte superior), células G3361/DsRed2 (centro), células G3361/EYFP (parte inferior). La **Figura 3(b)** es un gráfico del porcentaje medio (media  $\pm$  SEM) de células DsRed2<sup>+</sup> (% de DsRed2<sup>+</sup>/(% de DsRed2<sup>+</sup> + % de EYFP<sup>+</sup>) x 100) de origen ABCB5<sup>+</sup> o de células EYFP<sup>+</sup> (% de EYFP<sup>+</sup>/(% de DsRed2<sup>+</sup> + % de EYFP<sup>+</sup>) x 100) de origen ABCB5<sup>-</sup> representada frente a semanas post-inoculación de células de melanoma para tumores *in vivo* resultantes a t = 4 o 6 semanas (n = 3 repeticiones, respectivamente) y respectivos inóculos celulares xenoinjertados (n = 6). La **Figura 3(c)** es una serie de imágenes de microscopía de fluorescencia de doble canal de células G3361/DsRed2 y G3361/EYFP (filas superior y central) y de una sección de tejido congelado (fila inferior) derivada de tumores formados *in vivo* 6 semanas después del xenotrasplante s.c. en ratones NOD/SCID de inóculo de células 10% de G3361/DsRed2 ABCB5<sup>+</sup> y 90% de G3361/EYFP ABCB5<sup>-</sup>. Los paneles de la izquierda muestran el campo brillante, los paneles centrales izquierdos muestran DsRed2 (origen ABCB5<sup>+</sup>), los paneles centrales de la derecha muestran EYFP (origen ABCB5<sup>-</sup>), y los paneles más a la derecha muestran las imágenes fusionadas (tamaño de barras: 25  $\mu$ m). La **Figura 3(d)** (Paneles izquierdos) representan el análisis de citometría de flujo de expresión de DsRed2 y EYFP en células ABCB5<sup>+</sup> (parte superior) y células ABCB5<sup>-</sup> (parte inferior) derivadas de tumores formados en ratones NOD/SCID 6 semanas después de la inoculación de 10% de células G3361/DsRed2 ABCB5<sup>+</sup> y 90% de células G3361/EYFP ABCB5<sup>-</sup>. El (Panel derecho) es un gráfico que representa el porcentaje medio (media  $\pm$  SD) de células fluorescentes DsRed2 o EYFP (calculado como % de DsRed2<sup>+</sup>/(% de DsRed2<sup>+</sup> + % de EYFP<sup>+</sup>) x 100 o % de EYFP<sup>+</sup>/(% de DsRed2<sup>+</sup> + % de EYFP<sup>+</sup>) x 100, respectivamente) en subconjuntos de células ABCB5<sup>+</sup> y ABCB5<sup>-</sup> derivadas de n = 3 tumores replicados.

La **Figura 4** es una serie de gráficos e imágenes que representan el análisis del efecto del mAb (anticuerpo monoclonal) de ABCB5 en el crecimiento del xenoinjerto de melanoma. La **Figura 4(a)** es un gráfico que mide los volúmenes de los tumores (media  $\pm$  SEM) de xenoinjertos de melanoma representados frente a días después de la inoculación s.c. de células de melanoma en ratones Balb/c inmunológicamente deficientes ( $10^7$  células/inóculo) para el tratamiento con control isotipo no tratado (n = 18) (n = 10), o animales tratados con mAb anti-ABCB5 (n = 11). [Los días de administración i.p. del mAb se indican con flechas.] La **Figura 4(b)** es un gráfico que mide la tasa de formación del tumor (%) 58 días después de la inoculación s.c. de células de melanoma en ratones Balb/c inmunológicamente deficientes ( $10^7$  células/inóculo) en animales no tratados (n = 18), animales tratados con mAb control isotipo (n = 10) o animales tratados con mAb anti-ABCB5 (n = 11). La **Figura 4(c)** representa la inmunohistoquímica ABCB5 (panel izquierdo) y la histología convencional (H y E) (panel derecho) de xenoinjertos de melanoma humano en ratones inmunológicamente deficientes. (Los paneles representan secciones adyacentes.) Regiones ABCB5<sup>+</sup> segregan con zonas no melanizadas (a la izquierda de la línea punteada central), mientras que regiones ABCB5<sup>-</sup> se correlacionan con las regiones que muestran melanización parda-negra en partículas (a la derecha de la línea de puntos central). La **Figura 4(d)** muestra el análisis de citometría de flujo (FITC, F11) para el anticuerpo unido a la superficie en xenoinjertos de melanoma, 1 día post-administración i.p. de mAb anti-ABCB5 (línea continua) o mAb control de isotipo (sombreado). Un xenoinjerto de melanoma representativo aislado de un ratón tratado con mAb anti-ABCB5 exhibió un 20,5% de positividad en comparación con uno derivado de un animal tratado con control de isotipo. La **Figura 4(e)** resume una evaluación de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) mediante citometría de flujo de dos colores en cultivos de células diana de melanoma tratadas con mAb anti-ABCB5 o tratadas con mAb control de isotipo o marcadas con DiO no tratadas contrastadas con yoduro de propidio (PI) después de 24 h de co-cultivo con células inmunes efectoras sin marcar

derivadas de bazos de ratón inmunológicamente deficiente Balb/c (relaciones 1:40 diana a efector). (Los paneles de la izquierda) son una serie de resultados representativos de citometría de flujo de dos colores de ADCC con lisis, células diana DIO<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> encontradas en los cuadrantes superiores derechos de co-cultivos diana/efectores tratados con mAb anti-ABCB5 (parte superior), tratados con mAb control de isotipo (centro) o no tratados con Ab (parte inferior). (El panel derecho) representa un análisis de ADCC (% media  $\pm$  SEM) en  $n = 6$  experimentos réplicas en grupos de tratamiento tal como se ilustra arriba ([ADCC (%) = (DIO<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> porcentaje de positividad de muestra) - (media DIO<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> porcentaje de positividad de muestra no tratada con Ab)]).

La **Figura 5** resume la caracterización de células de melanoma humano no segregado, ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup> antes de los xenotrasplantes. La **Figura 5(a)** representa la expresión de ABCB5 de la superficie de citometría de flujo representativa o la tinción de control (FITC, F11) representada frente a la dispersión directa (FSC) determinada en cultivos no segregados de células de melanoma A375 humanas. La **Figura 5(b)** representa el análisis citométrico de flujo de un solo color representativo de la viabilidad celular para células de melanoma humano no segregado (paneles izquierdos), de ABCB5<sup>+</sup> (paneles centrales) y de ABCB5<sup>-</sup> (paneles derechos) según se determina por la incorporación celular y activación enzimática del colorante fluorescente calceína-AM. Los paneles superiores representan muestras de calceína-AM, los paneles inferiores no contienen controles de calceína-AM. Las células viables se encuentran en las puertas R1 de las gráficas FSC frente a F12. La **Figura(c)** es un gráfico que muestra la expresión de ABCB5 de células de melanoma humano G3361 ABCB5<sup>+</sup> o agotado en ABCB5<sup>+</sup> (ABCB5<sup>-</sup>) no segregadas y purificadas.

La **Figura 6** es un gráfico que resume el análisis de correlación de la expresión del gen ABCB5 con relación a los tiempos de duplicación del cultivo de células de melanoma. Correlación de Pearson de la expresión del gen ABCB5 relativa, determinada mediante RT-PCR en tiempo real (media  $\pm$  SD,  $n = 3$  experimentos independientes) y 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 (VRs) de la cadena pesada (HC) y de la cadena ligera (LC) del ARN mediante transcripción inversa. Ambos productos de la PCR de VR de HC y LC se clonaron en el vector de secuenciación de Invitrogen pCR2.1 y se transformaron en células TOP10.

La **Figura 8** es la secuencia de aminoácidos de la VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 9** es la secuencia de nucleótidos de la VR de HC del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 10** es la secuencia de aminoácidos de la VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 11** es la secuencia de nucleótidos de la VR de LC del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 12** es la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12.

La **Figura 13** es la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 3C2-1D12.

Descripción detallada

Células tumorales iniciadoras, capaces de autorrenovación y diferenciación, que son responsables del crecimiento del tumor, se han identificado en tumores malignos hematológicos humanos y cánceres sólidos. Si este tipo de poblaciones minoritarias está asociado con la progresión del tumor en pacientes humanos, la fijación específica como objetivo de células iniciadoras de tumores podría proporcionar una nueva estrategia para erradicar cánceres actualmente resistentes a la terapia sistémica. Se ha identificado de acuerdo con la invención una sub-población enriquecida para células iniciadoras de cáncer maligno humano definidas por expresión del mediador de quimiorresistencia ABCB5. Tal como se muestra en los Ejemplos que figuran más adelante, la fijación específica como objetivo de esta población minoritaria tumorigénica anula el crecimiento del tumor.

Los autores de la invención clonaron y caracterizaron recientemente ABCB5, un nuevo transportador humano de resistencia a múltiples fármacos que se demostró que era expresado preferentemente por células de linaje melanocítico. La inhibición de ABCB5 produce células de melanoma normalmente resistentes a la doxorrubicina. Han demostrado que la expresión de ABCB5 1) marca células de melanoma tumorigénico de fenotipo y función de células madre; y 2) la fijación específica como objetivo del compartimiento de células madre de melanoma ABCB5+ constituye un enfoque nuevo y muy prometedor que fija como objetivo células madre para la terapia del melanoma. Los datos se describen con más detalle en la sección de Ejemplos.

Adicionalmente, en experimentos en serie de xenotrasplante de ser humano a ratón, las células de melanoma ABCB5+ poseían una capacidad tumorigénica mayor que las poblaciones de ABCB5- a granel. Además de ello, el seguimiento del destino celular genético in vivo demostró que las células cancerosas ABCB5+ tumorigénicas eran

capaces de generar progenie ABCB5+ y ABCB5-, mientras que las células ABCB5- daban lugar exclusivamente a la progenie ABCB5-. Esta identificación de una relación específica entre un mecanismo de quimiorresistencia y células madre cancerígenas en un tumor maligno humano tiene implicaciones importantes para los enfoques que fijan como objetivo células madre para la terapia contra el cáncer.

5 También se ha descubierto de acuerdo con la invención que la ablación de células de melanoma ABCB5+ mediante enfoques inmunoterapéuticos fijados como objetivo puede representar una nueva estrategia para conseguir respuestas clínicas más duraderas que las obtenidas mediante estrategias terapéuticas dirigidas predominantemente a la población global de células tumorales. Por lo tanto, los autores de la invención investigaron si la ablación selectiva de células madre de melanoma ABCB5+ quimiorresistentes y tumorígenas humanas  
10 mediante administración sistémica de un anticuerpo monoclonal anti-ABCB5 (mAb clon 3C2-1D12) facilita la inhibición de la formación de tumores/erradicación de tumores en un modelo animal preclínico relevante de melanoma maligno humano que implica xenoinjertos de tumor de ser humano a ratón inmunológicamente deficiente.

Tal como se muestra con más detalle a continuación, se examinó la biodisponibilidad y la eficacia/especificidad de unión a melanoma del mAb anti-ABCB5 administrado in vivo en un modelo de xenoinjerto de melanoma humano a ratón. Con el fin de examinar si la administración del mAb anti-ABCB5 da como resultado niveles séricos in vivo detectables, se incubaron sueros de ratón con cultivos de células de melanoma humano recién cosechados, seguido de contraste de células con Ab secundario Ig anti-ratón de cabra conjugado con FITC y posterior análisis mediante citometría de flujo de un solo color. Se observó una unión significativa de Ab secundario Ig anti-ratón de cabra conjugado con FITC en aquellos cultivos de melanoma preincubados con sueros en todas las diluciones testadas derivadas de ratones tratados con mAb anti-ABCB5. La unión no se observó con sueros derivados de animales tratados con isotipo control o no tratados. La detección de 5,4% de positividad de ABCB5 en diluciones de sueros tan bajas como 1:100 (Figura 1A) fue consistente con la frecuencia de células ABCB5+ previamente informada 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 fusión 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 sistémicamente da como resultado niveles séricos de mAb in vivo eficaces. Los datos descritos en esta memoria demuestran, además, que administrado sistémicamente, el mAb anti-ABCB5 se une de manera eficiente y preferente a células de melanoma humano ABCB5+ xenoinjertadas in vivo, proporcionando evidencia de su idoneidad para los enfoques de fijación como objetivo terapéutico in vivo. Utilizando xenoinjertos de células de melanoma humano en ratones inmunológicamente deficientes, se demostró que la fijación específica como objetivo del compartimiento de células madre de melanoma ABCB5+ con anticuerpos era un enfoque eficaz de células madre dirigido a la terapia de melanoma.  
15  
20  
25  
30

La invención se basa en parte en el descubrimiento, el aislamiento y la 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. ABCB5 es un transportador de resistencia a múltiples fármacos que está presente en células madre cancerosas.  
35

Por lo tanto, las composiciones que contienen un anticuerpo monoclonal según se define en las reivindicaciones adjuntas pueden ser útiles en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer. Un sujeto significa un mamífero humano o vertebrado que incluye, pero no se limita a un perro, gato, caballo, cabra y primate, p. ej., mono. Por ejemplo, el cáncer es una de las principales causas de muerte en animales de compañía (es decir, gatos y perros). Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.  
40

Tal como se utiliza en esta memoria, el término tratar, tratado o tratando, cuando se utiliza 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 como también un tratamiento después de que el sujeto haya desarrollado la enfermedad para combatir la enfermedad, evitar que la enfermedad empeore o ralentizar la progresión de la enfermedad en comparación con la ausencia de la terapia.  
45

Un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer es aquel que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia ha demostrado tener una relación correlativa con una mayor probabilidad de desarrollar cáncer y sujetos expuestos a agentes causantes de cáncer tales como el tabaco, el amianto u otras toxinas químicas, o un sujeto que haya sido tratado previamente por cáncer y esté en aparente remisión. Un sujeto en riesgo de tener cáncer también incluye un sujeto que tiene lesiones precancerosas. Una lesión precancerosa es una zona de tejido que tiene propiedades alteradas y conlleva el riesgo de convertirse en cáncer de piel. Las lesiones precancerosas pueden ser provocadas, por ejemplo, por radiación UV, genética, exposición a carcinógenos tales como arsénico, alquitrán o radiación de rayos X.  
50  
55

Un sujeto que tiene un cáncer es un sujeto que tiene células cancerosas 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 endometrial; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasmas intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (p. ej., de células pequeñas y células no pequeñas); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer de recto; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y

5 cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. Preferentemente, el cáncer incluye células madre cancerígenas que expresan ABCB5.

Opcionalmente, antes del tratamiento, puede detectarse la presencia de células madre ABCB5 positivas utilizando el anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas. Los métodos de detección o diagnóstico proporcionados por la invención implican generalmente poner en contacto un anticuerpo monoclonal

10 aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas de la invención con una muestra en o de un sujeto. Preferiblemente, la muestra se recoge primero del sujeto, aunque también se prevén métodos de detección *in vivo*. La muestra puede incluir cualquier tejido o fluido corporal que se sospeche que alberga las células madre del cáncer. Por ejemplo, las células madre se encuentran comúnmente en o alrededor de la masa tumoral.

El anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas se une a ABCB5 y potencia la muerte tumoral. Debe entenderse que anticuerpos de este tipo son capaces de unir ABCB5 independientemente de su fuente. Por consiguiente, el anticuerpo monoclonal aislado según se define en las reivindicaciones adjuntas que se define como que se une a, por ejemplo, la célula de melanoma ABCB5 y es capaz de detectar y/o potenciar efectos anti-tumorales en, por ejemplo, células de melanoma, así como otros cánceres, tales como cáncer de mama.

15

Aunque no se pretende estar sujeto a ninguna teoría en particular, se cree que el tratamiento de tumores y cánceres puede fallar debido a que las células madre tumorigénicas no se fijan eficazmente como objetivo mediante tratamientos convencionales. Los anticuerpos monoclonales aislados según se define en las reivindicaciones adjuntas fijan específicamente como objetivo y están implicados en la destrucción de estas células. Por lo tanto, cuando estas moléculas se utilizan solas o en combinación con terapias convencionales, las células más agresivas del tumor pueden ser exterminadas.

20

Existen varios mecanismos posibles por los que 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 inmunológicamente deficiente receptor, incluyendo la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por macrófagos dependiente de anticuerpos (ABMC) y/o la inhibición de la función de ABCB5, que puede contribuir a la tumorigenicidad de células madre. Se predice que cualquiera de estos mecanismos se fija únicamente como objetivo al subconjunto de células tumorales que expresan ABCB5 en comparación con los controles. Los autores de la invención esperan también una fijación como objetivo terapéutica *in vivo* mediada por mAb anti-ABCB5 de células madre de melanoma ABCB5+ a través de quimiosensibilización o estrategias de ablación celular mediada por inmunotoxina. Dado que la administración fijada como objetivo de ABCB5 de toxinas (toxinas químicas o biológicas, radionucleidos) o de ARNs conjugados con mAb de ABCB5 hacia dianas genéticas específicas de células madre tumorales adicionales puede requerir la internalización de la toxina celular, los autores de la invención también examinaron la internalización celular del mAb anti-ABCB5 después de la unión en superficie a células de melanoma humano ABCB5+. Los resultados indican que las toxinas conjugadas con mAb anti-ABCB5 se pueden administrar específicamente a los compartimientos 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.

25

30

35

40

El término "anticuerpo" en esta memoria se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada, y moléculas similares a anticuerpos tales como scFv. Un anticuerpo nativo generalmente se refiere a glicoproteínas heterotetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada una de las cadenas pesadas tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada una de las cadenas ligeras 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 residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

45

50

Determinadas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada uno de los anticuerpos particulares para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres o cuatro segmentos denominados "regiones determinantes de la complementariedad" (CDRs) o "regiones hipervariables", tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de dominios variables se denominan marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro o cinco regiones FR, que adoptan en gran parte

55

una configuración de lámina  $\beta$ , conectadas por las CDRs, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina  $\beta$ . Las CDRs en cada una de las cadenas se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., NIH Publ. 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 exhiben diversas funciones efectoras tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

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

Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende una región variable de unión al antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera ( $C_L$ ) y dominios constantes de cadena pesada,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (p. ej., dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, p. ej., Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992), y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de bancos de fagos de anticuerpos. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos  $F(ab')_2$  (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos  $F(ab')_2$  se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes.

"Fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab',  $F(ab')_2$  y Fv; diacuerpos; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento  $F(ab')_2$  que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

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

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 por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio  $CH1$  de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en esta memoria para Fab', en la que el o los residuos cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Fragmentos de anticuerpo  $F(ab')_2$  originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

La expresión "región Fc" se utiliza para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que puede generarse por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para extenderse desde un residuo aminoácido en aproximadamente la posición Cys226, o desde aproximadamente la posición Pro230, hasta el 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  $CH4$ . Por "cadena de la región Fc" en esta memoria se quiere dar a entender una de las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc.



La "región de bisagra" y sus variaciones, tal como se utiliza en esta memoria, incluyen el significado conocido 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)

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

10 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (K) y lambda ( $\lambda$ ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

15 Además de las secuencias enumeradas en esta memoria, la divulgación pretende abarcar variantes funcionalmente equivalentes de estas secuencias que incluyen variantes de sustitución conservativas en la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, tal como se describe con mayor detalle a continuación.

20 Los anticuerpos monoclonales aislados según se define en las reivindicaciones adjuntas son útiles, entre otros, en métodos de diagnóstico destinados a detectar, en una muestra o de un sujeto, el antígeno ABCB5 o células que expresan ABCB5. Como mínimo, los anticuerpos monoclonales útiles en estos métodos solo necesitan reconocer y unirse a ABCB5, independientemente de si también potencian la muerte del tumor. Los anticuerpos se pueden emplear, por ejemplo, en análisis de diagnóstico FACS, transferencia Western e inmunohistoquímica. Dichos anticuerpos también pueden emplearse para usos de diagnóstico *in vivo*, en donde los mAbs conjugados con marcador pueden utilizarse para evaluar la carga del tumor, la localización del tumor o la masa tumoral residual después de la quimioterapia o la terapia quirúrgica de tumores que expresan ABCB5.

25 La invención pretende capturar anticuerpos monoclonales según se define en las reivindicaciones adjuntas de diversos isotipos. Los anticuerpos pueden ser de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE, IgM, IgA1, IgA2 o sIgA. La invención pretende capturar isotipos que se encuentran también en especies no humanas, así como, pero no limitadas a IgY en aves y tiburones. Vectores que codifican las regiones constantes de diversos isotipos son conocidos y se han descrito previamente. (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*. junio de 1993 25;21(12):2921-9; Norderhaug et al. *Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells*. *J Immunol Methods*. mayo de 1997 12;204(1):77-87.)

35 Los anticuerpos monoclonales de la invención son anticuerpos monoclonales aislados. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpos monoclonales aislados" significa que los anticuerpos monoclonales son sustancialmente puros y están esencialmente libres de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en una medida práctica y apropiada para su uso previsto. En particular, los anticuerpos monoclonales son suficientemente puros y están lo suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de sus células huésped como para ser útiles, por ejemplo, en la producción de preparaciones farmacéuticas o la secuenciación. Debido a que un anticuerpo monoclonal aislado de la invención se puede mezclar con un soporte farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el anticuerpo monoclonal puede comprender solo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. El anticuerpo monoclonal es, no obstante, sustancialmente puro ya que se ha separado sustancialmente de las sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos.

40 Los anticuerpos monoclonales de la invención se unen a ABCB5, preferiblemente de una manera selectiva. Tal como se utiliza en esta memoria, las expresiones "unión selectiva" y "unión específica" se utilizan indistintamente para referirse a la capacidad del péptido de unirse con mayor afinidad a ABCB5 que a compuestos no derivados de ABCB5. Es decir, los anticuerpos monoclonales que se unen selectivamente a ABCB5 no se unirán a compuestos no derivados de ABCB5 en la misma medida y con la misma afinidad que se unen a ABCB5, con la excepción de antígenos reactivos cruzados o moléculas hechas para ser imitaciones de ABCB5 tales como péptidos miméticos de hidratos de carbono 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, los anticuerpos monoclonales de la invención se unen únicamente a ABCB5.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, un anticuerpo monoclonal de unión que se une de forma selectiva o específica a la célula tumoral ABCB5 también puede unirse a ABCB5 de otras fuentes y se unirá con una menor afinidad (si es que lo hace) a compuestos no derivados de ABCB5. Una menor afinidad puede incluir al menos un 10% menos, un 20% menos, un 30% menos, un 40% menos, un 50% menos, un 60% menos, un 70% menos, un 80% menos, un 90% menos o un 95% menos.

10 "Anticuerpos aislados", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a anticuerpos que están sustancialmente separados físicamente de otro material celular (p. ej., separados de células que producen los anticuerpos) o de otro material que dificulta su uso en los métodos de diagnóstico o terapéuticos de la invención. Preferiblemente, los anticuerpos aislados están presentes en una población homogénea de anticuerpos (p. ej., una población de anticuerpos monoclonales). Sin embargo, las composiciones de anticuerpos aislados pueden combinarse con otros componentes tales como, pero no limitados a soportes, adyuvantes y similares farmacéuticamente aceptables.

15 "Células productoras de anticuerpos aisladas" incluyendo hibridomas aislados y células recombinantes aisladas (como las descritas en esta memoria), tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a células productoras de anticuerpos que están sustancialmente separadas físicamente de otras células, otro material corporal (p. ej., tejido y fluido ascítico), y otro material que dificulta su uso en la producción de, por ejemplo, una población de anticuerpos aislada y preferentemente homogénea.

20 Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo monoclonal soluble intacto aislado específico para ABCB5. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de inmunoglobulinas que se unen específicamente a un epítipo idéntico (es decir, determinante antigénico).

25 La divulgación pretende abarcar anticuerpos distintos de, por ejemplo, las secuencias de 3C2-1D12, con la condición de que anticuerpos de este tipo tengan las características de unión de los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria. Opcionalmente, estos anticuerpos adicionales también potencian el exterminio del tumor de las células cancerosas que expresan ABCB5. Un experto ordinario en la técnica puede identificar fácilmente anticuerpos que tienen las características funcionales de este anticuerpo monoclonal utilizando los ensayos de rastreo y unión expuestos en detalle en esta memoria.

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

30 La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en esta memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada uno de los anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque son sintetizados por el cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como es obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no ha de ser interpretado como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular.

40 Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por 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 discretos.

45 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (Pat. de EE.UU. N° 4.816.567).

50 En el método de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, tal como se describió anteriormente en esta memoria para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. Los linfocitos se fusionan luego con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59 - 103 (Academic Press, 1986)).

55 Las células de hibridoma, así preparadas, se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente

incluirán hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

5 Células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, soportan la producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE.UU., y SP-2 o células X63-Ag8-653 disponibles de American Type Culture Collection, Rockville, Md. EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984) y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

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

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

20 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos estándares (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer in vivo como tumores de ascitis en un animal.

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

30 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencía fácilmente utilizando procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra forma no producirían proteína de anticuerpos, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al., Curr. Opinión in Immunol., 5:256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

35 En una realización adicional, se pueden aislar anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos a partir de bancos de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas 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, utilizando bancos de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por combinación de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como estrategia para construir bancos de fagos muy grandes (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2226 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

45 Típicamente, tales polipéptidos no inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

50 Como es bien sabido en la técnica, solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a 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. American Society for Microbiology Press, Washington D.C.). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento y pueden mediar en la unión a receptores Fc en células fagocíticas, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del cual la región pFc' se ha escindido enzimáticamente, o el cual se ha producido sin la región pFc', designado un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, conserva los dos sitios de unión a antígeno de un anticuerpo intacto. A un fragmento F(ab')<sub>2</sub> aislado se alude como fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión a antígeno. De forma similar, un anticuerpo del cual la región

- 5 Fc se ha escindido enzimáticamente, o que se ha producido sin la región Fc, designado un fragmento Fab, conserva uno de los sitios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Procediendo adicionalmente, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unida covalentemente y una parte de la cadena pesada del anticuerpo designada Fd (región variable de la cadena pesada). Los fragmentos Fd son el principal determinante de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd puede estar asociado con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítipo en forma aislada.
- 10 Los términos Fab, Fc, pFc', F(ab')<sub>2</sub> y Fv se emplean con cualquiera de los significados inmunológicos estándar [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.].
- 15 En otras divulgaciones, las porciones Fc de los anticuerpos de la invención pueden reemplazarse para producir IgM así como anticuerpos IgG humanos que portan algunas o todas las CDRs de los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria. De particular importancia es la inclusión de una región de CDR3 que se une a ABCB5 y, en menor medida, las otras CDRs y porciones de las regiones marco de los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria. Estos anticuerpos humanos tendrán utilidad clínica particular en el sentido de que reconocerán y se unirán, de preferencia selectivamente, a ABCB5, pero no provocarán una respuesta inmune en seres humanos contra el propio anticuerpo.
- 20 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 secuencia nativa. Las variantes de la secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.
- 25 "Homología" se define como el porcentaje de residuos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología. Métodos y programas de ordenador para el alineamiento son bien conocidos en la técnica.
- 30 Se contempla la modificación de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en esta memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se realiza la secuencia.
- 35 Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" según lo descrito por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. Aquí, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (p. ej., residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con antígeno. Aquellas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan luego introduciendo variantes adicionales u otras variantes en, o para los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación per se no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo una exploración de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o la región diana y las inmunoglobulinas expresadas se rastrean para determinar la actividad deseada.
- 40 45 Las inserciones de la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.
- 50 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR.
- 55 Tal como se utiliza en esta memoria, "sustitución conservativa" se refiere a una sustitución de aminoácido que no altera la carga relativa o las características de tamaño del péptido en el que se realiza la sustitución del aminoácido.

Sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones hechas 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.

5 Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte 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., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

10 (2) polar no cargado: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) de carácter ácido: Asp (D), Glu (E)

(4) de carácter básico: Lys (K), Arg (R), His (H)

15 Alternativamente, los residuos que se producen de forma natural pueden dividirse en grupos basados en las propiedades de la cadena lateral común: (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) neutros hidrofílicos: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) de carácter ácido: Asp, Glu; (4) de carácter básico: His, Lys, Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativos o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

20 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (p. ej., un anticuerpo humanizado o humano). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para un desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo original del que se generan. Una manera conveniente de generar tales variantes de sustitución implica la maduración de afinidad utilizando la visualización de fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (p. ej., 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada uno de los sitios. Los anticuerpos, así generados, se muestran a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada una de las partículas. Las variantes presentadas en el fago se rastrean a continuación para determinar su actividad biológica (p. ej., afinidad de unión) tal como se describe en esta memoria. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar la mutagénesis por barrido de alanina para identificar residuos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente en la unión al antígeno. Alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en esta memoria. Una vez que se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a rastreo tal como se describe en esta memoria y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para un desarrollo posterior.

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

45 Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, 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 (p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (p. ej., una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína de bisagra.

50 De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo utilizado en los métodos de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo salvaje, p. ej., en la región Fc, además de la mutación de la secuencia de bisagra descrita en esta memoria. No obstante, estos anticuerpos conservarían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo salvaje. P. ej., se cree que pueden realizarse determinadas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión alterada (es decir, mejorada o disminuida) C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), p. ej., tal como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); Pat. de EE.UU. N° 5.648.260; Pat. de EE.UU. 5.624.821; y el documento WO94/29351 concernientes a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

Cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-ABCB5 también puede estar sustituido, generalmente, con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. Por el contrario, se pueden añadir enlaces cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en los casos en los que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se quiere dar a entender la delección de uno o más restos hidratos de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos típicamente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido, excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. Glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxil-aminoácido, lo más habitualmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o la sustitución por uno o más residuos serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Equivalencia funcional se refiere a una actividad equivalente (p. ej., la unión a ABCB5, o la mejora del exterminio de las células que expresan ABCB5), sin embargo, también abarca la variación en el nivel de dicha actividad. Por ejemplo, un equivalente funcional es una variante que se une a ABCB5 con afinidad menor, igual o mayor que los clones de anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria, siempre que la variante siga siendo útil en la invención (es decir, se una a ABCB5 y opcionalmente potencie el exterminio del tumor).

Tales sustituciones se pueden hacer mediante una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, sustituciones de aminoácidos se pueden realizar 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 particular o un péptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la CDR descritas en esta memoria. Estos y otros métodos para alterar un péptido que contiene CDR serán conocidos por los expertos ordinarios en la técnica y se pueden encontrar en referencias que recopilan tales métodos, p. ej., Sambrook o Ausubel, indicados anteriormente. En algunas realizaciones, sin embargo, debido al tamaño de las CDRs, puede ser más conveniente sintetizar los péptidos variantes utilizando un sintetizador de péptidos como los disponibles comercialmente. La actividad de las variantes funcionalmente equivalentes de la CDR de unión a ABCB5 puede someterse a ensayo mediante los ensayos de unión y, en algunos casos, los ensayos de actividad biológica comentados con más detalle más adelante. Tal como se utiliza en esta memoria, las expresiones "variante funcional", "variante funcionalmente equivalente" y "variante funcionalmente activa" se utilizan indistintamente.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "fragmento de anticuerpo funcionalmente activo" significa un fragmento de una molécula de anticuerpo que incluye una región de unión a ABCB5 de la invención que conserva la capacidad de unirse a ABCB5, respectivamente, preferiblemente de una manera específica. Dichos fragmentos pueden utilizarse tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, fragmentos de anticuerpos funcionalmente activos bien conocidos incluyen, pero no se limitan a fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y Fd. Estos fragmentos que carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión a tejido no específico que un anticuerpo intacto (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). Como otro ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla pueden construirse de acuerdo con los métodos descritos en la Pat. de EE.UU. Nº 4.946.778 expedida a Ladner et al. Tales anticuerpos de cadena sencilla incluyen las regiones variables de las cadenas ligera y pesada unidas por un resto enlazador flexible. También se ha informado de métodos para obtener un anticuerpo de dominio único ("Fd") que comprende un dominio único aislado de cadena pesada variable (véase, por ejemplo, Ward et al., *Nature* 341:644-646 (1989), que describen un método de rastreo para identificar un anticuerpo de cadena pesada de la región variable (anticuerpo V<sub>H</sub> de dominio único) con suficiente afinidad por su epítipo diana para unirse al mismo en forma aislada). Métodos para fabricar fragmentos de Fv recombinantes basados en secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo conocidas son conocidos en la técnica y se han descrito, p. ej., Moore et al., Patente de EE.UU. Nº 4.462.334. Otras referencias que describen el uso y la generación de fragmentos de anticuerpos incluyen, p. ej., 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., Patente de EE.UU. Nº 4.355.023) y porciones de moléculas de anticuerpos (Audilore-Hargreaves, Patente de EE.UU. Nº 4.470.925). Por lo tanto, los expertos en la técnica pueden construir fragmentos de anticuerpos a partir de diversas porciones de anticuerpos intactos sin destruir la especificidad de los anticuerpos para ABCB5.

En aspectos importantes de la divulgación, el fragmento de anticuerpo funcionalmente activo también conserva la capacidad de potenciar el exterminio de las células que expresan ABCB5. En este último caso, el fragmento de anticuerpo incluye una región Fc, así como un dominio de unión a epítipo. La región Fc permite que el fragmento de anticuerpo se una a las células positivas del receptor de Fc, que posteriormente fagocitan el epítipo unido por la región Fab del anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales definidos en las reivindicaciones adjuntas pueden comprender, además, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras sub-secuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos marco de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Struct. Biot.*, 2:593-596 (1992)].

Métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que típicamente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el 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)], sustituyendo CDRs o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Pat. de EE.UU. N° 4.816.567), en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar para producir los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "mejor ajuste", se rastrea la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor frente al banco completo de secuencias conocidas de dominio variable humanas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método utiliza una región de marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es además importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse del receptor y se pueden importar secuencias, de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el o los antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente implicados de manera más sustancial en la influencia de la unión al antígeno.

Un ejemplo de anticuerpo humanizado de interés en esta memoria comprende residuos determinantes de la complementariedad de dominio pesado variable DYYMY (SEQ ID NO: 3); TINDGGTHTY (SEQ ID NO:4); y/o DDYYYYGSHFDAMDY (SEQ ID NO: 5), que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de esos residuos de CDR, p. ej., en donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o

aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR pesadas variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad.

El anticuerpo humanizado puede comprender restos que determinan la complementariedad del dominio ligero variable RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 6); LVSNLES (SEQ ID NO: 7); y/o QHIRELTR (SEQ ID NO: 8), p. ej., además de esos residuos de CDR de dominio pesado variable en el párrafo anterior. Dichos anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los residuos de CDR anteriores, p. ej., en donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR ligera variables anteriores.

La presente solicitud también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se unen a ABCB5. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, p. ej., uno que comprende las secuencias ligeras y/o pesadas variables de SEQ ID NOs 2 y 1, respectivamente. El anticuerpo de afinidad madurado se une preferiblemente a ABCB5 con una afinidad superior a la del mAb 3C2-1D12 murino.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

La solicitud de patente europea 0239400 proporciona una enseñanza ilustrativa de la producción y el uso de anticuerpos monoclonales humanizados en los que al menos la porción CDR de un anticuerpo murino (u otro mamífero no humano) se incluye en el anticuerpo humanizado. Brevemente, los siguientes métodos son útiles para construir un anticuerpo monoclonal CDR humanizado que incluye al menos una porción de una CDR de ratón. Se prepara un primer vector de expresión replicable que incluye un promotor adecuado unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos un dominio variable de una cadena pesada o ligera de Ig y el dominio variable que comprende regiones estructurales 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 enlazado operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de una cadena ligera o pesada de Ig humana complementaria, respectivamente. Una línea celular se transforma entonces con los vectores. Preferiblemente, la línea celular es una línea celular de mamífero inmortalizada de origen linfocítico tal como una línea celular de mieloma, hibridoma, trioma o cuadroma, o es una célula linfocítica normal que se ha inmortalizado por transformación con un virus. La línea celular transformada se cultiva luego en condiciones conocidas por los expertos en la técnica para producir el anticuerpo humanizado.

Tal como se establece en la solicitud de patente europea 0239400 son bien conocidas varias técnicas en la técnica para crear los dominios de anticuerpos particulares a insertar en el vector replicable. (Vectores preferidos y las técnicas recombinantes se discuten con mayor detalle más adelante). Por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el dominio se puede preparar mediante síntesis de oligonucleótidos. Alternativamente, un gen sintético que carece de las regiones CDR en el que cuatro regiones marco se fusionan junto con sitios de restricción adecuados en las uniones, de modo que los casetes CDR subclonados, sintéticos o restringidos, de doble cadena con extremos adhesivos podrían ligarse en las uniones de las regiones marco. 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 oligonucleótidos. Cada uno de estos métodos es bien conocido en la técnica. Por lo tanto, los expertos en la técnica pueden construir anticuerpos humanizados que contienen una región CDR murina sin destruir la especificidad del anticuerpo por su epítopo.

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 realizado utilizando cualquier técnica para producir anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en ratones mutantes de este tipo de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, p. ej., Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); y las Pat. de EE.UU. N°s 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Alternativamente, la tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) puede utilizarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes



de dominio de inmunoglobulina variable (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en un gen de proteína de cubierta principal o secundario de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla 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 exhibe esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La visualización de fagos se puede realizar en una diversidad de formatos; para su revisión ver, p. ej., Johnson, Kevin S y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos del gen V para la visualización del fago. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron una diversidad de anticuerpos anti-oxazolona de un pequeño banco combinatorio aleatorio de genes 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 frente a una diversidad de antígenos (incluidos auto-antígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véanse también, las Pat. de EE.UU. N°s 5.565.332 y 5.573.905. Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas in vitro (véanse las Pat. de EE.UU. N°s 5.567.610 y 5.229.275).

Anticuerpos monoclonales humanos también pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la *Patente de EE.UU. N° 5.567.610, expedida a Borrebaeck et al., Patente de EE.UU. N° 565,354, expedida a Ostberg, Patente de EE.UU. N° 5,571,893, expedida a Baker et al, Kozber, J. Immunol.* 133: 3001 (1984), Brodeur, et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, Nueva York, 1987), y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86-95 (1991).

La presente divulgación también abarca el uso de fragmentos de región variable de cadena sencilla (scFv). Los fragmentos de región variable de cadena sencilla se preparan enlazando regiones variables de cadena ligera y/o pesada utilizando un péptido de enlace corto. Cualquier péptido que tenga suficiente flexibilidad y longitud se puede utilizar como un enlazador en un scFv. Habitualmente, el enlazador se selecciona para que tenga poca o ninguna inmunogenicidad. Un ejemplo de un péptido enlazador es múltiples residuos GGGGS, que puentean el extremo carboxi de una región variable y el extremo amino de otra región variable. Se pueden utilizar también otras secuencias de enlazador.

Toda o cualquier parte de la cadena pesada o ligera se puede utilizar en cualquier combinación. Típicamente, las regiones variables completas se incluyen en el scFv. Por ejemplo, la región variable de la cadena ligera se puede enlazar a la región variable de la cadena pesada. Alternativamente, una parte de la región variable de la cadena ligera se puede enlazar a la región variable de la cadena pesada, o a una parte de la misma. También se contemplan scFvs en los que la región variable de la cadena pesada es del anticuerpo de interés, y la región variable de la cadena ligera es de otra inmunoglobulina.

Los scFvs se pueden ensamblar en cualquier orden, por ejemplo, V<sub>H</sub>-enlazador-V<sub>L</sub> o V<sub>L</sub>-enlazador-V<sub>H</sub>. Puede haber una diferencia en el nivel de expresión de estas dos configuraciones en sistemas de expresión particulares, en cuyo caso puede preferirse una de estas formas. También se pueden preparar scFvs en tándem, tales como (X)-enlazador-(X)-enlazador-(X), en donde X son polipéptidos que forman los anticuerpos de interés, o combinaciones de estos polipéptidos con otros polipéptidos. En otra realización, los polipéptidos de anticuerpo de cadena sencilla no tienen un polipéptido enlazador, o simplemente un enlazador corto inflexible. Configuraciones posibles son V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> y V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. El enlace es demasiado corto para permitir la interacción entre V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> dentro de la cadena, y las cadenas forman homodímeros con un sitio de unión al antígeno V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub> en cada uno de los extremos. A este tipo de moléculas se las denomina en la técnica "diacuerpos".

Las regiones variables de cadena sencilla pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv se puede utilizar un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, un plásmido adecuado que contiene un polinucleótido que codifica el scFv puede introducirse en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, tal como células de levadura, planta, insecto o mamífero, o procariota, tal como E. coli, y la proteína expresada se puede aislar utilizando técnicas estándares de purificación de proteínas.

Las condiciones de expresión deberían ser tales que el polipéptido scfv pueda asumir una estructura terciaria óptima. Dependiendo del plásmido utilizado y la célula huésped, puede ser necesario modular la tasa de producción. Por ejemplo, el uso de un promotor más débil, o la expresión a temperaturas más bajas, puede ser necesario para optimizar la producción de scFv plegado adecuadamente en sistemas procarióticos; o puede ser preferiblemente para expresar scFv en células eucarióticas.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígenos, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más

completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

5 Los anticuerpos monoclonales en esta memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de este tipo de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

10 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para ABCB5, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína de superficie celular o un receptor o subunidad de receptor. Métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de  
15 dos pares de inmunoglobulina de cadena pesada/cadena ligera, en donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta generalmente se consigue por etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker et al.,  
20 EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

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

25 Adicionalmente, los péptidos pequeños que incluyen los que contienen la región CDR3 de unión a ABCB5 pueden sintetizarse fácilmente o producirse por medios recombinantes para producir el péptido de la divulgación. Métodos de este tipo son bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Los péptidos se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando sintetizadores de péptidos automatizados que están disponibles comercialmente. Los péptidos se pueden producir mediante técnicas recombinantes incorporando el ADN que expresa el péptido en un vector de expresión y transformando las células con el vector de expresión para producir el péptido.

30 Los péptidos, incluyendo anticuerpos, pueden someterse a ensayo para determinar su capacidad de unirse a ABCB5 utilizando ensayos de unión convencionales conocidos en la técnica. Como un ejemplo de un ensayo adecuado, ABCB5 se puede inmovilizar sobre una superficie (tal como en un pocillo de una placa de múltiples pocillos) y luego se pone en contacto con un péptido marcado. La cantidad de péptido que se une al ABCB5 (y, por lo tanto, se inmoviliza sobre la superficie) se puede cuantificar a continuación para determinar si un péptido particular se une a ABCB5. Alternativamente, la cantidad de péptido no unido a la superficie también puede medirse. En una variación  
35 de este ensayo, el péptido puede someterse a ensayo en cuanto a su capacidad para unirse directamente a una célula que expresa ABCB5.

La unión de péptidos también se puede analizar utilizando 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 descritos en esta memoria, tal como se muestra por una disminución en la unión del anticuerpo o  
40 fragmento monoclonal, entonces es probable que el péptido y el anticuerpo monoclonal se unan al mismo, o al menos un epítipo solapante. En este sistema de ensayo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está marcado y el ABCB5 está inmovilizado sobre la superficie sólida. De esta forma, se pueden identificar péptidos competitivos que incluyen anticuerpos competidores. La invención abarca péptidos y en particular anticuerpos (y fragmentos de los mismos) que compiten con el anticuerpo 3C2 1D12 por la unión a ABCB5 (es decir, anticuerpos que reconocen y se unen a los mismos epítopos que 3C2 1D12).  
45

La presente divulgación también abarca moléculas pequeñas que se unen a ABCB5 y aumentan el exterminio del tumor. Dichas moléculas de unión se pueden identificar por métodos de rastreo convencionales, tales como procedimientos de presentación en fagos (p. ej., métodos descritos en Hart et al., J. Biol. Chem. 269:12468 (1994)). Hart et al. informan de un banco de presentación de fagos filamentosos para identificar nuevos ligandos peptídicos.  
50 En general, los bancos de presentación en fagos, utilizando, p. ej., el fago M13 o fd, se preparan utilizando procedimientos convencionales tales como los descritos en la referencia anterior. Los bancos generalmente muestran inserciones que contienen de 4 a 80 residuos de aminoácidos. Las inserciones representan opcionalmente una matriz de péptidos completamente degenerada o sesgada. Los ligandos que tienen las propiedades de unión apropiadas se obtienen seleccionando los fagos que expresan en su superficie un ligando que se une a la molécula diana. Estos fagos se someten entonces a varios ciclos de reelección para identificar el fago que expresa el ligando peptídico que tiene las características de unión más útiles. Típicamente, los fagos que exhiben las mejores características de unión (p. ej., mayor afinidad) se caracterizan adicionalmente por análisis de ácidos nucleicos para identificar las secuencias de aminoácidos particulares del péptido expresado en la superficie del fago en la longitud  
55

óptima del péptido expreso para lograr una unión óptima. El banco de péptidos o anticuerpos con fagos se describe también en Brissette R et al Curr Opin Drug Discov Devel. 2006 de mayo;9(3): 363-9.

5 Alternativamente, las moléculas de unión pueden identificarse a partir de bancos combinatorios. Se han descrito muchos tipos de bancos combinatorios. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5712171 (que describe métodos para construir matrices de construcciones moleculares sintéticas formando una pluralidad de construcciones moleculares que tienen la cadena principal del armazón de la molécula química y modificando al menos una ubicación en la molécula en una matriz ordenada lógicamente); 5.962.412 (que describe métodos para fabricar polímeros que tienen propiedades físico-químicas específicas); y 5.962.736 (que describe compuestos específicos en forma de matriz).

10 Los expertos en la técnica pueden identificar otras moléculas de unión siguiendo la directriz descrita en esta memoria. La tecnología del banco se puede utilizar para identificar moléculas pequeñas, incluidos pequeños péptidos, que se unen a ABCB5 e interrumpen su función. Una ventaja de utilizar bancos para la identificación de antagonistas es la manipulación fácil de millones de supuestos candidatos diferentes de tamaño pequeño en volúmenes de reacción pequeños (es decir, en reacciones de síntesis y rastreo). Otra ventaja de los bancos es la capacidad de sintetizar antagonistas que de otro modo no podrían alcanzarse utilizando fuentes naturales, particularmente en el caso de restos no peptídicos.

15 Los bancos de moléculas pequeñas pueden rastrearse por sus efectos moduladores sobre el transporte de eflujo de rodamina-123 mediado por ABCB5, de lo que se puede deducir la unión a ABCB5. Sustratos o inhibidores potenciales de la función de ABCB5 también se pueden identificar al correlacionar la expresión del gen o proteína ABCB5 en el panel NCI-60 de líneas celulares de cáncer del National Cancer Institute con potencias de fármacos establecidas de > 100.000 compuestos para estas líneas celulares, similares a las descritas en Frank et al. Cancer Research 2005 para seleccionar 119 agentes anticancerígenos estándares.

20 Muchos, sino todos, de estos compuestos se pueden sintetizar utilizando bancos recombinantes o químicos. Se puede generar una amplia variedad de compuestos candidatos a partir de bancos de compuestos sintéticos o naturales. Los bancos de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o pueden producirse fácilmente. Los bancos y compuestos naturales y sintéticamente producidos pueden modificarse fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Además, los compuestos que se sabe que se unen y actúan con ello como antagonistas de los canales de calcio pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc. para producir análogos estructurales que pueden funcionar de manera similar o quizás con mayor especificidad.

25 También se pueden generar bancos combinatorios de moléculas pequeñas. Un banco combinatorio de pequeños compuestos orgánicos es una colección de análogos estrechamente relacionados que difieren entre sí en uno o más puntos de diversidad y se sintetizan mediante técnicas orgánicas que utilizan procesos multi-etapa. Los bancos combinatorios incluyen un amplio número de pequeños compuestos orgánicos. Un tipo de banco combinatorio se prepara por medio de métodos de síntesis paralelos para producir un conjunto de compuestos. Un "conjunto de compuestos", tal como se utiliza en esta memoria, es una colección de compuestos identificables por sus direcciones espaciales en coordenadas cartesianas y dispuestas de manera que cada uno de los compuestos tiene un núcleo molecular común y uno o más elementos de diversidad estructural variable. Los compuestos en un conjunto de compuestos de este tipo se producen en paralelo en recipientes de reacción separados, con cada uno de los compuestos identificado y rastreado por su dirección espacial. Ejemplos de mezclas de síntesis paralelas y métodos de síntesis paralelos se proporcionan en la solicitud de patente PCT publicada W095/18972, publicada el 13 de julio de 1995 y la Patente de EE.UU. N° 5.712.171 concedida el 27 de enero de 1998 y su correspondiente Solicitud de patente PCT publicada W096/22529.

30 Ensayos de unión estándares son bien conocidos en la técnica, y un cierto número de ellos son adecuados en la presente invención que incluyen ELISA, ensayo de unión competitiva (tal como se describe anteriormente), ensayos en sándwich, ensayos de radiorreceptores utilizando péptidos marcados radiactivamente o anticuerpos radiomarcados, inmunoensayos, etc. La naturaleza del ensayo no es esencial, siempre que sea suficientemente sensible para detectar la unión de un pequeño número de péptidos.

35 También se pueden incluir una diversidad de otros reactivos en la mezcla de unión. Estos incluyen reactivos tales como sales, tampones, proteínas neutras (p. ej., albúmina), detergentes, etc. que pueden utilizarse para facilitar la unión óptima. Un reactivo de este tipo también puede reducir las interacciones no específicas o de fondo de los componentes de la reacción. También se pueden utilizar 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 normalmente se une específicamente a ABCB5. Estas condiciones preferiblemente imitarán las condiciones fisiológicas. El orden de adición de los componentes, la temperatura de incubación, el tiempo de incubación y otros parámetros del ensayo pueden determinarse fácilmente. Una experimentación de este tipo simplemente implica la optimización de los parámetros de ensayo, no la composición fundamental del ensayo. Las temperaturas de incubación están típicamente entre 4°C y 40°C. Los tiempos de incubación preferiblemente se minimizan para

facilitar un cribado rápido y de alto rendimiento, y típicamente están 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.

5 Típicamente, una pluralidad de mezclas de ensayo se ejecutan en paralelo con diferentes péptidos o diferentes concentraciones de péptidos para obtener una respuesta diferente a las diversas concentraciones. Una de estas concentraciones sirve como un control negativo, es decir, a una concentración cero de ABCB5 o a una concentración de ABCB5 por debajo de los límites de la detección del ensayo.

10 A menudo se utiliza una etapa de separación para separar el péptido o anticuerpo unido del no unido. La etapa de separación se puede lograr de una diversidad de maneras. Convenientemente, al menos uno de los componentes (p. ej., péptido o anticuerpo) se inmoviliza sobre un sustrato sólido mediante unión a ABCB5. Los componentes no unidos se pueden separar fácilmente de la fracción unida. El sustrato sólido puede estar hecho de una amplia diversidad de materiales y en una amplia diversidad de formas, p. ej., columnas o geles de poliacrilamida, agarosa o sepharose, placas de microtitulación, microperlas, partículas de resina, etc. La etapa de separación preferiblemente incluye múltiples enjuagues 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 típicamente incluye los componentes de la mezcla de incubación que no participan en uniones específicas, tales como sales, tampón, detergente, proteína no específica, etc. En los casos en los que el sustrato sólido es una perla magnética, las perlas se pueden lavar una o varias veces con una solución de lavado y se pueden aislar utilizando un imán.

20 Las moléculas descritas en esta memoria se pueden utilizar solas o en conjugados con otras moléculas tales como agentes de detección o citotóxicos en los métodos de detección y tratamiento de la invención, tal como se describe con más detalle en esta memoria.

25 Típicamente, uno de los componentes habitualmente comprende, o está acoplado o conjugado a un marcador detectable. Un marcador detectable es un resto, cuya presencia puede determinarse directa o indirectamente. En general, la detección del marcador implica una emisión de energía por parte del marcador. El marcador puede detectarse directamente por su capacidad para emitir y/o absorber fotones u otras partículas atómicas de una longitud de onda particular (p. ej., radiactividad, luminiscencia, densidad óptica o de electrones, etc.). Un marcador puede detectarse indirectamente por su capacidad de unir, reclutar y, en algunos casos, escindir otro resto que puede emitir o absorber luz de una longitud de onda particular (p. ej., etiqueta de epítipo tal como el epítipo FLAG, etiqueta enzimática tal como peroxidasa de rábano picante). etc.). Un ejemplo de detección indirecta es el uso de un primer marcador de enzima que escinde un sustrato en productos visibles. El marcador puede ser de naturaleza química, peptídica o de molécula de ácido nucleico, aunque no es tan limitado. Otros marcadores detectables incluyen isótopos radiactivos tales como  $P^{32}$  o  $H^3$ , marcadores luminiscentes tales como fluorocromos, marcadores ópticos o de densidad de electrones, etc., o etiquetas de epítipos tales como el epítipo FLAG o el epítipo HA, biotina, avidina y etiquetas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, etc. El marcador puede estar unido a un péptido durante o después de su síntesis. Existen muchos diferentes marcadores y métodos de marcaje conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Ejemplos de los tipos de marcadores que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos ordinarios en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para los péptidos descritos en esta memoria, o podrán determinarlos utilizando una experimentación rutinaria. Además, el acoplamiento o la conjugación de estos marcadores a los péptidos de la invención se puede realizar utilizando técnicas estándares comunes a los expertos ordinarios en la técnica.

45 Otra técnica de marcaje que puede dar como resultado una mayor sensibilidad consiste en acoplar las moléculas descritas en esta memoria a haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos pueden ser alterados entonces específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es habitual utilizar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos específicos contra haptenos.

50 La conjugación de los péptidos, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos a un marcador detectable facilita, entre otras cosas, el uso de tales agentes en ensayos de diagnóstico. Otra categoría de marcadores detectables incluye marcadores de diagnóstico y formación de imágenes (denominados generalmente marcadores detectables *in vivo*) tales como, por ejemplo, imágenes de resonancia magnética (MRI): Gd(DOTA); para medicina nuclear:  $^{201}Tl$ , radionucleido emisor de gamma  $^{99m}Tc$ ; para tomografía por emisión de positrones (PET): isótopos emisores de positrones,  $(^{18}F)$ -fluorodesoxiglucosa ( $(^{18}F)$  FDG),  $(^{18}F)$ -fluoruro, cobre-64, gadodiamida y radioisótopos de Pb(II) tales como  $^{203}Pb$ ;  $^{111}In$ .

55 Las conjugaciones o modificaciones descritas en esta memoria emplean una química rutinaria, química que no forma parte de la invención y química que es bien conocida por los expertos en la técnica de la química. El uso de grupos protectores y enlazadores conocidos tales como enlazadores mono- y hetero-bifuncionales están bien documentados en la bibliografía y no se repetirán aquí.

Tal como se utiliza en esta memoria, "conjugado" significa dos entidades unidas de forma estable por cualquier medio físico-químico. Es importante que la naturaleza de la unión sea tal que no perjudique sustancialmente la efectividad de ninguna de las dos entidades. Teniendo en cuenta estos parámetros, se puede emplear cualquier enlace covalente o no covalente conocido por los expertos ordinarios en la técnica. En algunas realizaciones, se prefiere el enlace covalente. La conjugación no covalente incluye interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas, interacciones de alta afinidad, tales como complejo de biotina-avidina y biotina-estreptavidina y otras interacciones de afinidad. Tales medios y métodos de unión son bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica.

Se puede utilizar una diversidad de métodos para detectar el marcador, dependiendo de la naturaleza del marcador y otros componentes del ensayo. Por ejemplo, el marcador puede detectarse mientras está unida al sustrato sólido o después de la separación del sustrato sólido. Los marcadores pueden detectarse directamente a través de densidad óptica o de electrones, emisiones radiactivas, transferencias de energía no radiactivas, etc., o pueden detectarse indirectamente con conjugados de anticuerpos, conjugados de estreptavidina-biotina, etc. Métodos para detectar los marcadores son bien conocidos en la técnica.

Los conjugados de la invención también incluyen un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (p. ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma, o una toxina de molécula pequeña), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las Pat. de EE.UU. N°s 5053394, 5.770.710, así como esperamicinas (Pat de EE.UU. N° 5,877,296). Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar en los conjugados incluyen cadena A de difteria, fragmentos no enlazantes de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diuantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo,  $Tc^{99}$  o  $I^{123}$ , o un marcador de espín para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes de resonancia magnética, mri), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcadores tales como  $Tc^{sup.99m}$  o  $I^{sup.123}$ ,  $Resup.186$ ,  $Resup.188$  e  $Insup.111$  pueden unirse mediante un residuo cisteína en el péptido.  $I^{trio-90}$  se puede unir a través de un residuo lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Anticuerpos monoclonales en inmunoescintigrafía" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se pueden hacer utilizando 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 adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase al documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil a ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene un disulfuro (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); Pat. de EE.UU. N° 5.208.020).

Se han determinado las secuencias responsables de la especificidad de los anticuerpos monoclonales de la invención. Por consiguiente, los péptidos de acuerdo con la divulgación se pueden preparar utilizando tecnología de ADN recombinante. Hay entidades en los Estados Unidos que realizarán esta función comercialmente, tales como la Universidad Thomas Jefferson y la Scripps Protein and Nucleic Acids Core Sequencing Facility (La Jolla, California). Por ejemplo, el ADNc de la región variable puede prepararse por reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores degenerados o no degenerados (derivados de la secuencia de aminoácidos). El ADNc puede subclonarse

para producir cantidades suficientes de ADN de doble cadena para la secuenciación mediante reacciones o equipos de secuenciación convencionales.

5 Con conocimiento de las secuencias de ácidos nucleicos de los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-ABC5, un experto ordinario en la técnica es capaz de producir ácidos nucleicos que codifican este anticuerpo o que codifican los diversos fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanizados o polipéptidos arriba descritos. Se contempla que dichos ácidos nucleicos se unirán operativamente a otros ácidos nucleicos formando un vector recombinante para la clonación o para la expresión de los péptidos.

10 La presente divulgación incluye cualquier vector recombinante que contiene las secuencias codificantes, o parte de las mismas, ya sea para la transformación procariota o eucariota, transfección o terapia génica. Dichos vectores pueden prepararse utilizando técnicas de biología molecular convencionales, conocidas por los expertos en la técnica, y comprendería secuencias codificantes de ADN para la región CDR (y preferiblemente 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 especificadas 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 la exportación o secreción. Dichos vectores pueden transformarse o transfectarse en células procarióticas (Huse et al., *Science* 246:1275, 1989, Ward y col., *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, 991) o eucarióticas (Whittle et al., 1987 y Burton et al., 1994) o utilizadas para terapia génica (Marasco et al., 1993 y Duan et al., 1994) por técnicas convencionales, conocidas por aquellos con habilidad en la técnica.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, un "vector" puede ser cualquiera de un cierto número de ácidos nucleicos en los que puede insertarse una secuencia deseada mediante restricción y ligamiento para el transporte entre diferentes entornos genéticos o para la expresión en una célula huésped. Los vectores están compuestos típicamente de ADN, aunque también están disponibles vectores de ARN. Vectores incluyen, pero no están limitados a, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula huésped y que se caracteriza, además, por uno o más sitios de restricción de endonucleasa en los que el vector puede cortarse de una manera determinable y en la que puede ligarse una secuencia de ADN deseada de forma tal que el nuevo vector recombinante conserva su capacidad de replicarse en la célula huésped. En el caso de los plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede ocurrir muchas veces a medida que el plásmido aumenta en número de copias dentro de la bacteria huésped o solo una vez por huésped antes de que el huésped se reproduzca mediante mitosis. En el caso del fago, la replicación puede ocurrir activamente durante una fase lítica, o pasivamente durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es uno en el que se puede insertar una secuencia de ADN deseada mediante restricción y ligamiento de manera que se una operativamente a secuencias reguladoras y se puede expresar como un transcrito de ARN. Los vectores pueden contener, además, una o más secuencias marcadoras, adecuadas para su uso en la identificación de células que han sido o no transformadas o transfectadas con el vector. Marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen la resistencia o la sensibilidad a los antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas, cuyas actividades son detectables mediante ensayos estándares conocidos en la técnica (p. ej.,  $\beta$ -galactosidasa o fosfatasa alcalina), y genes que afectan visiblemente al fenotipo de células, huéspedes, colonias o placas transformados o transfectados. Vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma y expresión de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los que están unidos operativamente.

45 Los vectores de expresión de la presente divulgación incluyen secuencias reguladoras operativamente unidas a una secuencia de nucleótidos que codifica uno de los péptidos de la invención. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "secuencias reguladoras" significa secuencias de nucleótidos que son necesarias para, o que conduzcan a la transcripción de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido deseado y/o que son necesarios o conducen a la traducción del transcrito resultante en el polipéptido deseado. Secuencias reguladoras incluyen, pero no se limitan a secuencias 5' tales como operadores, promotores y secuencias de unión a ribosomas, y secuencias 3' tales como señales de poliadenilación. Los vectores pueden incluir opcionalmente secuencias conductoras o señal 5', secuencias 5' o 3' que codifican productos de fusión 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 apropiado están dentro de la capacidad y la discreción de un experto ordinario en la técnica. La posterior purificación de los péptidos puede realizarse mediante cualquiera de una diversidad de medios estándares conocidos en la técnica.

55 Un vector preferido para el rastreo de péptidos, pero no necesariamente preferido para la producción en masa de los péptidos de la invención, 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 de la invención y, opcionalmente, (3) un dominio de proteína de fusión. El vector incluye secuencias reguladoras de ADN para expresar el polipéptido de fusión, preferiblemente secuencias reguladoras procarióticas. Vectores de este tipo pueden ser construidos por los expertos en la técnica y han sido descritos por 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, págs. 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).

5 Un polipéptido de fusión puede ser útil para la purificación de los péptidos de la invención. El dominio de fusión puede incluir, por ejemplo, una cola poli-His que permite la purificación en columnas de Ni<sup>2+</sup> o la proteína de unión a maltosa del vector pMAL comercialmente disponible (New England BioLabs, Beverly, MA). Un dominio de fusión actualmente preferido, pero de ninguna manera necesario, es un anclaje a membrana de fago filamentoso. Este dominio es particularmente útil para seleccionar bancos de presentación de fagos de anticuerpos monoclonales, pero puede ser de menor utilidad para la producción en masa de anticuerpos. El anclaje a membrana de fago  
10 filamentoso es preferiblemente un dominio de la proteína de cubierta cpIII o cpVIII capaz de asociarse con la matriz de una partícula de fago filamentoso, incorporando de ese modo el polipéptido de fusión a la superficie del fago, para permitir la unión de la fase sólida a antígenos o epítomos específicos y, con ello, permitir el enriquecimiento y la selección de los anticuerpos o fragmentos específicos codificados por el vector fagémido.

15 La señal de secreción es un dominio de péptido conductor de una proteína que se fija como objetivo la membrana proteica de la célula huésped, tal como la membrana periplásmica de bacterias gram-negativas. Una señal de secreción preferida para *E. coli* es una señal de secreción de pelB. Las secuencias de residuos de aminoácidos predichas del dominio de la señal de secreción de dos variantes productoras del gen pelB de *Erwinia carotova* se describen en Lei, et al. (*Nature* 381:543-546, 1988). La secuencia líder de la proteína pelB se ha utilizado previamente como una señal de secreción para proteínas de fusión (Better, et al., *Science* 240:1041-1043, 1988;  
20 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). Secuencias de residuos aminoácidos para otros dominios de polipéptido de señal de secreción de *E. coli* útiles en esta invención se puede encontrar en Oliver, En Neidhard, F.C. (ed.), *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1:56-69 (1987).

25 Para alcanzar altos niveles de expresión génica en *E. coli*, es necesario utilizar no solo promotores fuertes para generar grandes cantidades de ARNm, sino también sitios de unión de ribosomas para asegurar que el ARNm se traduzca de manera eficiente. En *E. coli*, el sitio de unión del ribosoma incluye un codón de iniciación (AUG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud situada 3-11 nucleótidos cadena arriba del codón de iniciación (Shine, et al., *Nature* 254:34, 1975). La secuencia, AGGAGGU, que se denomina la secuencia de Shine-Dalgarno (SD), es complementaria al extremo 3' del ARNr 16S de *E. coli*. La unión del ribosoma al ARNm y la secuencia en el extremo  
30 3' del ARNm puede verse afectada por varios factores: (i) el grado de complementariedad entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNr 16S; (ii) el espaciamiento y posiblemente la secuencia de ADN que se extiende entre la secuencia 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 logra midiendo el nivel de expresión de genes en plásmidos en los que este espaciamiento está sistemáticamente alterado. La comparación de diferentes ARNm demuestra que hay secuencias estadísticamente  
35 preferidas desde las posiciones -20 a +13 (en donde la A del AUG es la posición 0) (Gold, et al., *Annu. Rev. Microbiol.*, 35:365, 1981). Se ha demostrado que las secuencias conductoras influyen drásticamente en la traducción (Roberts, et al., 1979a, b supra); y (iii) la secuencia de nucleótidos que sigue al AUG, que afecta a la unión a ribosomas (Taniguchi, et al., *J. Mol. Biol.*, 118:533, 1978).

40 Las secuencias reguladoras 3' definen al menos un codón de terminación (parada) en el marco con y unido operativamente al polipéptido de fusión heterólogo.

45 En un huésped de expresión procariótico, el vector utilizado incluye un origen procariótico de replicación 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 extracromosómicamente en una célula huésped procariótica, tal como una célula huésped bacteriana, transformada con la misma. Tales orígenes de replicación son bien conocidos en la técnica. Orígenes de replicación preferidos son aquellos que son eficientes en el organismo huésped. Una célula huésped procariótica, por ejemplo, es *E. coli*. Para uso de un vector en *E. coli*, un origen de replicación preferido es ColE1 encontrado en pBR322 y una diversidad de otros plásmidos comunes. También se prefiere el origen de replicación p15A encontrado en pACYC y sus derivados. Los replicones ColE1 y p15A se han utilizado ampliamente en biología  
50 molecular, están disponibles en una diversidad de plásmidos y están descritos por Sambrook. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Además, las realizaciones que incluyen un replicón procariótico preferiblemente también incluyen un gen cuya expresión confiere una ventaja selectiva, tal como resistencia a los fármacos, a un huésped bacteriano transformado con el mismo. Los genes típicos de resistencia bacteriana a fármacos son aquellos que confieren resistencia a  
55 ampicilina, tetraciclina, neomicina/kanamicina o cloranfenicol. Los vectores también contienen típicamente sitios de restricción convenientes para la inserción de secuencias de ADN traducibles. Vectores a modo de ejemplo son los plásmidos pUC18 y pUC19 y vectores derivados tales como pcDNAII disponible de Invitrogen (San Diego, CA).

5 Cuando el péptido es un anticuerpo que incluye secuencias tanto de cadena pesada como de cadena ligera, estas secuencias pueden codificarse en vectores separados o, más convenientemente, pueden expresarse mediante un solo vector. La cadena pesada y ligera puede, después de la traducción o después de la secreción, formar la estructura heterodimérica de moléculas de anticuerpos naturales. Un anticuerpo heterodimérico de este tipo puede estabilizarse o no mediante enlaces disulfuro entre las cadenas pesada y ligera.

10 Un vector para la expresión de anticuerpos heterodiméricos, tales como los anticuerpos intactos de la invención o los anticuerpos del fragmento  $F(ab')_2$ , Fab o Fv de la invención, es una molécula de ADN recombinante adaptada para recibir y expresar secuencias de ADN primera y segunda traducibles. 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 traducibles en dos casetes separados presentes en el vector, para formar dos cistrones separados para expresar el primer y segundo polipéptido de un anticuerpo heterodimérico. Al vector de expresión de ADN para expresar dos cistrones se le alude como vector de expresión dicistrónico.

15 Preferiblemente, el vector comprende un primer casete que incluye secuencias reguladoras de ADN cadena arriba y cadena abajo unidas operativamente a través de una secuencia de nucleótidos adaptada para la unión direccional a un ADN insertado. La secuencia traducible cadena arriba codifica preferiblemente la señal de secreción tal como se describió anteriormente. El casete incluye secuencias reguladoras de ADN para expresar el primer polipéptido de anticuerpo que se produce cuando una secuencia de ADN traducible por inserción se inserta direccionalmente en el casete a través de la secuencia de nucleótidos adaptada para el ligamiento direccional.

20 El vector de expresión dicistrónico también contiene un segundo casete para expresar el segundo polipéptido de anticuerpo. El segundo casete incluye una segunda secuencia de ADN traducible que codifica preferiblemente una señal de secreción, tal como se describió anteriormente, unida operativamente en su extremo 3' a través de una secuencia de nucleótidos adaptada para el ligamiento direccional a una secuencia de ADN cadena abajo del vector que típicamente define al menos un codón de parada en el marco de lectura del casete. La segunda secuencia de ADN traducible está operativamente unida en su extremo 5' a secuencias reguladoras de ADN que forman los elementos 5'. El segundo casete es capaz, tras la inserción de una secuencia de ADN traducible (ADN de inserción), de expresar el segundo polipéptido de fusión que comprende una señal de secreción con un polipéptido codificado por el ADN insertado.

30 Los péptidos también se pueden producir mediante células eucarióticas 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 eucarióticas se unen operativamente a las secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. El diseño y la selección de un vector eucariótico apropiado están dentro de la capacidad y la discreción de un experto ordinario en la técnica. La posterior purificación de los péptidos puede realizarse mediante cualquiera de una diversidad de medios estándares conocidos en la técnica.

35 Células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-ABCB5 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped de insectos permisivas de huéspedes 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 la transfección están disponibles públicamente, p. ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y estos virus se pueden utilizar como el virus en esta memoria de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

40 Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

45 Las células de vertebrados también son particularmente interesantes como células huésped. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); Células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Nat. 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); 50 células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario 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).

55 Las células huésped se transforman con la expresión o los vectores de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos anti-ABCB5 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea



apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo anti-ABCB5 de esta invención se pueden cultivar en una diversidad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham's F10 (Sigma), Medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), (Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), Pat de EE.UU. N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Pat. de EE.UU. Re. 30.985 puede utilizarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES). ), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN.TM.), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros complementos necesarios en concentraciones apropiadas que conocerán los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las que se utilizaron previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión,

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos en partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se separan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con mayor frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poros controlados o poli(estirendivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla puede someterse a cromatografía de interacción hidrofóbica de bajo pH utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizado a bajas concentraciones de sal (p. ej., de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Tal como se utiliza en esta memoria con respecto a los ácidos nucleicos, el término "aislado" significa: (i) amplificado *in vitro* mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido recombinantemente por clonación; (iii) purificado, tal como por escisión y separación en gel; o (iv) sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que es fácilmente manipulable por 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 5' y 3' o para la que se han descrito secuencias de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera aislada, pero existe una secuencia de ácido nucleico en su estado natural en su huésped natural no es. Un ácido nucleico aislado puede estar sustancialmente purificado, pero no es necesario. Por ejemplo, un ácido nucleico que se aísla dentro de un vector de clonación o expresión no es puro, ya que puede comprender solo un pequeño porcentaje del material en la célula en la que reside. Un ácido nucleico de este tipo se aísla, sin embargo, según se utiliza en esta memoria el término porque es fácilmente manipulable por técnicas estándares conocidas por los expertos ordinarios en la técnica.

Tal como se utiliza en esta memoria, se dice que una secuencia codificante y secuencias reguladoras están "unidas operativamente" cuando están unidas covalentemente de tal manera que colocan la expresión o transcripción de la secuencia codificante bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias codificantes se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están operativamente unidas si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' da como resultado la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN (1) no resulta en la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región de promotor para dirigir la transcripción de las secuencias codificantes, o (3) interfiere con la capacidad de la transcripción de ARN correspondiente para traducirse en una proteína. Por lo tanto, una región de promotor se uniría operativamente a una secuencia codificante si la región de promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de modo que la transcripción resultante se pudiera traducir en la proteína o el polipéptido deseado.

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos de células, pero en general incluirá, según sea necesario, secuencias 5' no transcritivas y 5' no traducidas implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de remate, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, dichas secuencias reguladoras 5' no transcriptoras incluirán una región de promotor que incluye una secuencia de promotor para el control transcripcional del gen unido operativamente. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras cadena arriba, según se desee.

Las composiciones y los métodos de la invención se pueden mejorar mediante la utilización en combinación con otros procedimientos para cáncer y lesiones precancerosas. En algunos casos, el procedimiento de tratamiento implica la administración de otro agente terapéutico tal como un agente anticancerígeno, que incluye, pero no se limita a agentes quimioterapéuticos y radiación. Los agentes quimioterapéuticos pueden seleccionarse del grupo que

5 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 poliferposano, MMI270, BAY 12-9566, inhibidor de la farnesil transferasa RAS, inhibidor de la farnesil transferasa, MMP, dacarbazina, LY294002, PX866, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hicamtin/Topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrono/Mitroxantrona, Metaret/Suramin,

10 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/liposomal doxorubicina, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/Capecitabina, Furtulon/Doxifluridina, Ciclopax/paclitaxol oral, Taxoide Oral, SPU-077/Cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor de oncogen RAS, BMS-182751/platino oral, UFT(Tegafur/Uracilo), Ergamisol/Levamisol, potenciador de eniluracilo/776C85/5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/Irinotecan, Tumodex/Ralitrexed, Leustatina/Cladribina, Paxex/Paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposomal, Caelix/doxorubicina liposomal, Fludara/Fludarabina, Farmarrubicina/Epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naftalimida, LU 103793/Dolastatina, Caetix/doxorubicina liposomal, Gemzar/Gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de PARP, D4809/Dexifosamida, lfes/Mesnex/lfosamida, Vumon/Tenipósido, Paraplatino/Carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepesida/Etopósido, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, profármaco de guanina arabinósido, análogo de Taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfelan y ciclofosfamida, aminoglutetimida, Asparaginasa, Busulfan, Carboplatino, Clorombucilo, Citarabine HCl, Dactinomycin, Daunorubicina HCl, Estramustina fosfato sódico, Etopósido (VP16-213), Floxuridina, Fluorouracilo (5-FU),

25 Flutamida, Hidroxiurea (hidroxicarbamida), Ifosfamida, Interferón Alfa-2a, Alfa-2b, acetato de Leuprolida (análogo de factor de liberación de LHRH), Lomustina (CCNU), Mecloroetamina HCl (nitrógeno mostaza), Mercaptopurina, Mesna, Mitotano), Mitoxantrona HCl, Octreotida, Plicamicina, Procarbazona HCl, Estreptozocina, Tamoxifen citrato, Tioguanina, Tiotepa, sulfato de Vinblastina, Amsacrina (m-AMSA), Azacitidina, Ertropoyetina, Hexametilmelamina (HMM), Interleucina 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 ello.

Los métodos de la invención se pueden realizar con terapias para tratar el cáncer tales como cirugía y radiación. Los métodos de la invención también se pueden realizar en combinación con un agente terapéutico que es un ARN corto aislado que dirige la degradación específica para la secuencia de un ARNm específico de cáncer a través de un proceso conocido como interferencia de ARN (ARNi). En algunas realizaciones, el ARNm específico para cáncer es ABCB5. Se sabe que el proceso se produce en una amplia diversidad de organismos, incluyendo embriones de mamíferos y otros vertebrados. Se ha demostrado que el ARNs se procesa en segmentos de ARN de 21-23 nucleótidos (nt) de longitud y, además, que median en la interferencia de ARN en ausencia de ARNs más largo. Por lo tanto, estos fragmentos de 21-23 nt son mediadores específicos para la secuencia de la degradación de ARN y se denominan aquí ARNsi o ARNi. Métodos de la invención abarcan el uso de estos fragmentos (u oligonucleótidos producidos de forma recombinante o sintetizados químicamente de la misma o de naturaleza similar) para permitir fijar como objetivo ARNm específicos para el cáncer para la degradación en células de mamífero útiles en las aplicaciones terapéuticas comentadas en esta memoria.

Los métodos para el diseño de los ARN que median en ARNi y los métodos para la transfección de los ARN en células y animales son bien conocidos en la técnica y las moléculas de ARNi están fácilmente disponibles comercialmente (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 (Hamburg, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE.UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE.UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE.UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE.UU.) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido)). Los ARN se sintetizan de preferencia químicamente utilizando fosoramiditas ribonucleósidos apropiadamente protegidos y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Más convenientemente, los ARNsi se obtienen a partir de proveedores de síntesis de oligonucleótidos de ARN comercial enumerados en esta memoria. En general, los ARN no son demasiado difíciles de sintetizar y se proporcionan fácilmente en una calidad adecuada para ARNi. Una síntesis típica de ARN a escala de 0,2 μmol proporciona aproximadamente 1 miligramo de ARN, que es suficiente para 1000 experimentos de transfección utilizando un formato de placa de cultivo tisular de 24 pocillos.

55 El ARNsi específico de ADNc específico para cáncer se diseña preferiblemente seleccionando una secuencia que no está dentro de 50-100 pb del codón de inicio y el codón de terminación, evita regiones intrónicas, evita estiramientos de 4 o más bases tales como AAAA, CCCC, evita regiones con contenido en GC <30% o >60%, evita repeticiones y la secuencia de bajo complejo, y evita los sitios de polimorfismo de un solo nucleótido. La secuencia diana puede tener un contenido en GC de alrededor del 50%. La secuencia fijada como objetivo a ARNsi puede evaluarse adicionalmente utilizando una búsqueda de homología BLAST para evitar los efectos fuera de diana en otros genes o secuencias. Los controles negativos se diseñan aleatorizando secuencias de ARNsi fijadas como objetivo. El ARN control tiene preferiblemente la misma longitud y composición de nucleótidos que el ARNsi, pero tiene al menos 4-5

- bases que no coinciden con el ARNsi. Las moléculas de ARN de la presente invención pueden comprender un grupo 3' hidroxilo. Las moléculas de ARN pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena; moléculas de este tipo pueden ser de extremos romos o comprender extremos colgantes (p. ej., 5', 3') de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nucleótidos de longitud (p. ej., nucleótidos de pirimidina, nucleótidos de purina). Con el fin de potenciar aún más la estabilidad del ARN de la presente invención, los colgantes 3' se pueden estabilizar contra la degradación. El ARN puede estabilizarse incluyendo nucleótidos de purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, se tolera la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, p. ej., la sustitución de colgantes 3' de 2 nucleótidos de uridina por 2'-desoxitimidina y no afecta a la eficacia del ARNi. La ausencia de un 2' hidroxilo potencia significativamente la resistencia a la nucleasa del colgante en el medio de cultivo tisular.
- Las moléculas de ARN utilizadas en los métodos de la presente invención pueden obtenerse utilizando un cierto número de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ARN se puede sintetizar químicamente o producir de forma recombinante utilizando métodos conocidos en la técnica. Tales métodos se describen en las solicitudes de patente de EE.UU. publicadas N°s US2002-0086356A1 y US2003-0206884A1.
- Los métodos descritos en esta memoria se utilizan para identificar u obtener moléculas de ARN que son útiles como mediadores específicos para secuencias de degradación de ARNm específico para el cáncer y, por lo tanto, para inhibir proteínas que contribuyen en el funcionamiento de células cancerosas. La expresión de ABCB5, por ejemplo, puede inhibirse en seres humanos con el fin de evitar que la proteína se traduzca y, por lo tanto, prevenir su función in vivo.
- Se puede utilizar cualquier ARN en los métodos de la presente invención, siempre que tenga suficiente homología con el gen específico para el cáncer para mediar en ARNi. El ARN para usar en la presente invención puede corresponder a todo el gen específico para el cáncer o a una parte del mismo. No existe límite superior en la longitud del ARN que se puede utilizar. Por ejemplo, el ARN puede oscilar entre aproximadamente 21 pares de bases (pb) del gen y la longitud completa del gen o más. En una realización, el ARN utilizado en los métodos de la presente invención tiene aproximadamente 1000 pb de longitud. En otra realización, el ARN tiene aproximadamente 500 pb de longitud. En aún otra realización, el ARN tiene aproximadamente 22 pb de longitud. En determinadas realizaciones, la longitud preferida del ARN de la invención es de 21 a 23 nucleótidos. La secuencia de ABCB5 es conocida, por ejemplo, véase la Patente de EE.UU. 6846883 (que se refiere a ABCB5 como 7p P-glicoproteína).
- Los anticuerpos monoclonales de unión a ABCB5 de la invención se administran al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. Una "cantidad efectiva para tratar el cáncer" es una cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de la invención podría ser la cantidad necesaria para c (i) exterminar una célula cancerosa; (ii) inhibir el crecimiento adicional del cáncer, es decir, detener o ralentizar su desarrollo; y/o (iii) sensibilizar una célula cancerosa a un agente anticancerígeno o terapéutico. De acuerdo con algunos aspectos de la invención, una cantidad eficaz es la cantidad de anticuerpo monoclonal según se define en la reivindicación 1 solo o en combinación con un medicamento contra el cáncer, que cuando se combina o co-administra o administra solo, da como resultado una respuesta terapéutica al cáncer, ya sea en la prevención o el tratamiento del cáncer. El efecto biológico puede ser la mejora y/o la eliminación absoluta de los síntomas resultantes del cáncer. En otra realización, el efecto biológico es la abrogación completa del cáncer tal como se evidencia, por ejemplo, por la ausencia de un tumor o una biopsia o frotis de sangre que está libre de células cancerosas.
- La cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de la invención en el tratamiento de un cáncer o en la reducción del riesgo de desarrollar un cáncer puede variar dependiendo del anticuerpo monoclonal específico utilizado, del modo de administración del anticuerpo monoclonal, y si se usa solo o en combinación. La cantidad efectiva para cualquier aplicación particular también puede variar dependiendo de factores tales como el cáncer que se está tratando, el compuesto particular que se administra, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto ordinario en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal particular de la invención sin necesidad de una experimentación excesiva. Combinado con las enseñanzas proporcionadas en esta memoria, eligiendo entre los diversos compuestos activos y factores de ponderación, tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de efectos secundarios adversos y modo de administración preferido, se puede planear un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico efectivo que no provoca una toxicidad sustancial y que aún es enteramente eficaz para tratar al sujeto particular.
- Dosis objeto de los compuestos descritos en esta memoria varían típicamente de aproximadamente 0,1 µg a 10.000 mg, más típicamente de aproximadamente 1 µg/día a 8000 mg, y lo más típicamente de aproximadamente 10 µg a 100 µg. Expresado en términos del peso corporal del sujeto, las dosificaciones típicas varían de aproximadamente 0,1 µg a 20 mg/kg/día, más típicamente de aproximadamente 1 a 10 mg/kg/día, y lo más típicamente 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 los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, la condición física, el tamaño y el peso. Estos son factores bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica y pueden abordarse con nada más que una experimentación rutinaria. En general, se prefiere que se utilice una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con un criterio médico sólido.

También se contemplan dosis múltiples. En algunos casos, cuando los anticuerpos monoclonales de la invención se administran con un medicamento contra el cáncer, se utiliza una dosificación sub-terapéutica de las moléculas o el medicamento contra el cáncer, o una dosificación sub-terapéutica de ambos, en el tratamiento de un sujeto que tiene, o en está en riesgo de desarrollar cáncer. Cuando las dos clases de fármacos se utilizan juntas, el medicamento contra el cáncer se puede administrar en una dosis sub-terapéutica para producir un resultado terapéutico deseable. Una "dosis sub-terapéutica", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una dosificación que es menor que la dosificación que produciría un resultado terapéutico en el sujeto si se administra en ausencia del otro agente. Así, la dosis sub-terapéutica de un medicamento contra el cáncer es una que no produciría el resultado terapéutico deseado en el sujeto en ausencia de la administración de los anticuerpos monoclonales de la invención.

Dosis terapéuticas de medicamentos contra el cáncer son bien conocidas 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, 18ª ed., 1990; así como muchas otras referencias médicas en las que confía la profesión médica como guía para el tratamiento del cáncer. Dosificaciones terapéuticas de anticuerpos también se han descrito en la técnica.

Está disponible una diversidad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del anticuerpo anti-ABC5 particular seleccionado, de la afección particular que se trata y de la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de esta invención, en términos generales, pueden ponerse en práctica utilizando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, es decir, cualquier modo que produzca niveles eficaces de protección sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Modos de administración preferidos son las vías parenterales. El término "parenteral" incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intraesternal, o técnicas de infusión. Otras vías incluyen, pero no están limitadas a, oral, nasal, dérmica, sublingual y local.

Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, soportes compatibles, adyuvantes y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos.

El anticuerpo monoclonal de la invención puede administrarse por cualquier vía ordinaria para administrar medicamentos. Dependiendo del tipo de cáncer a tratar, el anticuerpo monoclonal se puede inhalar, ingerir o administrar por vías sistémicas. Las vías sistémicas incluyen oral y parenteral. Los medicamentos inhalados son preferidos en algunas realizaciones, debido a la administración directa al pulmón, particularmente en pacientes con cáncer de pulmón. Varios tipos de inhaladores de dosis medidas se utilizan regularmente para la administración por inhalación. Estos tipos de dispositivos incluyen inhaladores de dosis medidas (MDI), MDI accionado por la respiración, inhalador de polvo seco (DPI), cámaras espaciadoras/de retención en combinación con MDI y nebulizadores. Vías de administración preferidas incluyen, pero no se limitan a oral, parenteral, intramuscular, intranasal, intratraqueal, intratecal, intravenosa, inhalatoria, ocular, vaginal y rectal. Para uso en terapia, se puede administrar una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal de la invención a un sujeto de cualquier modo que libere el ácido nucleico al órgano o tejido afectado. La "administración" de la composición farmacéutica de la presente invención puede realizarse por cualquier medio conocido por el experto en la técnica.

De acuerdo con los métodos de la invención, el anticuerpo monoclonal según se define en las reivindicaciones se puede administrar en una composición farmacéutica. En general, una composición farmacéutica comprende el péptido de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable. Soportes farmacéuticamente aceptables para péptidos, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos son bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Tal como se utiliza en esta memoria, un soporte farmacéuticamente aceptable significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos, p. ej., la capacidad del péptido de unirse a ABC5.

Soportes farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales que son bien conocidos en la técnica. Soportes farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo para péptidos en particular se describen en la Pat. de EE.UU. N° 5.211.657. Preparaciones de este tipo pueden contener rutinariamente sal, agentes tampón, conservantes, soportes compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. Cuando se utilizan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero sales no farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la invención. Sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a las preparadas a partir de los siguientes ácidos: 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 o alcalinotérreos tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Los anticuerpos monoclonales definidos en las reivindicaciones se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, líquidas o gaseosas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos,

soluciones, depósitos, inhalantes e inyecciones, y formas habituales para administración oral, parenteral o quirúrgica. La divulgación también abarca composiciones farmacéuticas que están formuladas para administración local, tal como mediante implantes.

5 Composiciones adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, comprimidos, pastillas, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada del agente activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

10 Cuando los anticuerpos monoclonales según se definen en las reivindicaciones se utilizan terapéuticamente, en determinadas realizaciones una vía deseable de administración puede ser mediante aerosol pulmonar. Técnicas para preparar sistemas de administración de aerosol que contienen compuestos son bien conocidas por los expertos en la técnica. En general, tales sistemas deben utilizar componentes que no perjudiquen significativamente las propiedades biológicas de los péptidos (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, "Aerosols", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, págs. 1694-1712.

15 Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y las condiciones para producir aerosoles sin recurrir a una experimentación excesiva.

20 Los anticuerpos monoclonales según se definen en las reivindicaciones se pueden administrar directamente a un tejido. Preferiblemente, el tejido es uno en el que se encuentran las células madre cancerosas. Alternativamente, el tejido es uno en el que es probable que surja el cáncer. La administración directa al tejido se puede lograr mediante inyección directa. Los anticuerpos monoclonales se pueden administrar una vez o, alternativamente, se pueden administrar en una pluralidad de administraciones. Si se administran múltiples veces, los péptidos se pueden administrar a través de diferentes vías. Por ejemplo, las primeras (o las primeras pocas) administraciones pueden realizarse directamente en el tejido afectado, mientras que las administraciones posteriores pueden ser sistémicas.

25 Para la administración oral, el anticuerpo monoclonal se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Estos soportes permiten que el anticuerpo monoclonal se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para la ingesta oral por un sujeto a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, fécula de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden agregarse agentes disgregantes tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en solución salina o tampones para neutralizar las condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin ningún soporte.

35 Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de barniz y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

40 Las preparaciones farmacéuticas que pueden utilizarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. También se pueden utilizar microesferas formuladas para administración oral. Dichas microesferas se han definido bien en la técnica. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para tal administración.

45 Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

50 Para la administración por inhalación, el anticuerpo monoclonal para uso de acuerdo con la presente invención puede administrarse convenientemente en forma de una presentación por pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para uso en un inhalador o insuflador que

contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Técnicas para preparar sistemas de administración de aerosol son bien conocidas por los expertos en la técnica. En general, sistemas de este tipo deberían utilizar componentes que no perjudiquen significativamente las propiedades biológicas del agente activo (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, "Aerosols", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, págs. 1694-1712. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y condiciones para producir aerosoles sin recurrir a una experimentación excesiva.

Los anticuerpos monoclonales según se definen en las reivindicaciones, cuando es deseable administrarlos sistémicamente, pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, p. ej., mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar 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.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles, acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los soportes acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de líquidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Las dosis más bajas resultarán de otras formas de administración, tal como la administración intravenosa. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente en las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis más altas (o dosis efectivamente más altas mediante una vía de administración diferente, más localizada) en la medida en que lo permita la tolerancia del paciente. Se contemplan dosis múltiples por día para alcanzar niveles sistémicos apropiados de compuestos.

En aún otras realizaciones, el vehículo preferido es una micropartícula o implante biocompatible que es adecuado para la implantación en el receptor mamífero. Implantes bioerosionables a modo de ejemplo que son útiles de acuerdo con este método se describen en la solicitud internacional PCT N° PCT/US/03307 (Publicación N° WO 95/24929, titulado "Sistema de administración de genes poliméricos", reivindicando la prioridad de la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 213.668, presentada el 15 de marzo de 1994). El documento PCT/US/03307 describe una matriz polimérica biocompatible, preferiblemente biodegradable, para contener una macromolécula biológica. La matriz polimérica puede utilizarse para lograr la liberación sostenida del agente en un sujeto. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el agente descrito en esta memoria puede encapsularse o dispersarse dentro de la matriz polimérica biocompatible, preferiblemente biodegradable, descrita en el documento PCT/US/03307. La matriz polimérica preferiblemente está en forma de una micropartícula tal como una microesfera (en donde el agente se dispersa a través de una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en donde el agente se almacena en el núcleo de una cubierta polimérica). Otras formas de la matriz polimérica para contener el agente incluyen películas, revestimientos, geles, implantes y stents. 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 se implanta el dispositivo de matriz. El tamaño del dispositivo de matriz polimérica adicionalmente se selecciona de acuerdo con el método de administración que se ha de utilizar, típicamente inyección en un tejido o la administración de una suspensión por aerosol en las zonas nasal y/o pulmonar. La composición de la matriz polimérica puede seleccionarse para tener tanto tasas de degradación favorables como para formarse de un material que sea bioadhesivo, para aumentar aún más la eficacia de la transferencia cuando el dispositivo se administra a una superficie vascular, pulmonar o de otro tipo. La composición de la matriz también se puede seleccionar para que no se degrade, sino que se libere por difusión durante un período de tiempo prolongado.

Ambas matrices poliméricas biodegradables y no biodegradables se pueden utilizar para administrar los agentes de la invención al sujeto. Se prefieren las matrices biodegradables. Polímeros de este tipo pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren los polímeros sintéticos. El polímero se selecciona en función del período de tiempo durante el cual se desea la liberación, generalmente del orden de unas pocas horas a un año o más. Típicamente, la liberación a lo largo de un período que varía entre unas pocas horas y tres hasta doce meses es lo más deseable. El polímero está opcionalmente en forma de un hidrogel que puede absorber hasta aproximadamente 90% de su peso en agua y adicionalmente está reticulado opcionalmente con iones multivalentes u otros polímeros.

En general, los agentes de la invención pueden administrarse utilizando el implante bioerosionable por medio de difusión, o más preferiblemente, por degradación de la matriz polimérica. Polímeros sintéticos a modo de ejemplo que se pueden utilizar para formar el sistema de suministro biodegradable incluyen: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquilenos), poli(tereftalatos de alquilenos), poli(alcoholes vinílicos), poliviniléteres, ésteres polivinílicos, poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y co-polímeros de los mismos, alquil celulosa, hidroxialquil celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitro celulosa, 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-ftalato de celulosa, carboxiletil celulosa, triacetato de celulosa, sulfato de celulosa sal sódica, 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 vinílicos), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno y polivinilpirrolidona.

Ejemplos de polímeros no biodegradables incluyen etileno acetato de vinilo, ácido poli(met)acrílico, poliamidas, copolímeros y mezclas de los mismos.

- 10 Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butílico), poli(ácido valérico) y poli(lactida-cocaprolactona), y polímeros naturales tales como alginato y otros polisacáridos que incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquilenos, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones rutinariamente realizadas por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrofílicas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan por hidrólisis enzimática o exposición al agua in vivo, por erosión superficial o en masa.

- 20 Polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en esta memoria, 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).

- 25 Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de liberación en el tiempo, de liberación retardada o de liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas del péptido, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de liberación y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 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 tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silastic; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; tabletas comprimidas que utilizan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas erosivos en los que el agente reductor de plaquetas está contenido en una forma dentro de una matriz como las descritas en las Patentes de EE.UU. N°s 4.452.775, 4.675.189 y 5,736,152 y (b) sistemas difusionales en los que un componente activo permea a una velocidad controlada de un polímero tal como se describe en las Patentes de EE.UU. N°s 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden utilizar sistemas de administración de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

- 40 El uso de un implante de liberación prolongada a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento profiláctico de sujetos con riesgo de desarrollar un cáncer recurrente. La liberación a largo plazo, tal como se utiliza en esta memoria, significa que el implante está construido y dispuesto para administrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 30 días, y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

- 50 Formulaciones terapéuticas de los anticuerpos se pueden preparar para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con soportes, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Soportes, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que 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 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de

sales tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar casos específicos de la práctica de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Como resultará evidente para un experto ordinario en la técnica, el anticuerpo monoclonal según se define en las reivindicaciones adjuntas encontrará aplicación en una diversidad de composiciones y métodos.

## Ejemplos

### 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 comercialmente de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero de bovino fetal al 10%, 6 mmol/L de HEPES, 2 mmol/L de L-glutamina, y 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora humidificada como se describió previamente. Las líneas celulares G3361/DsRed2 y G3361/EYFP se generaron por transfección estable de células de melanoma G3361 con proteína fluorescente roja de *Discosoma* sp. (DsRed2) o la variante amarilla-verde mejorada (EYFP) de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* junto con la señal de retención nuclear de T-antígeno grande del virus de simio 40 (Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. y Smith, A.E. Una secuencia de aminoácidos corta capaz de especificar la ubicación nuclear. Cell 39, 499-509 (1984)), utilizando 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 describió previamente. Los cultivos clonales G3361/DsRed y G3361/EYFP se generaron a partir de cultivos establemente transfectados mediante dilución limitante. Células de melanoma clínico ( $n = 6$  pacientes) se derivaron recientemente de muestras quirúrgicas de acuerdo con los protocolos de investigación de sujetos humanos aprobados por los CEI de la Facultad de Medicina de la Universidad de Würzburg o del Instituto Wistar, Filadelfia, PA.

Anticuerpos. El mAb IgG1κ anti-ABCB5 3C2-1D12 específico se utilizó en esta memoria en los estudios de expresión. Se utilizó el mAb 3C2-1D12 conjugado con FITC para analizar la pureza de subconjuntos de melanoma ABCB5<sup>+</sup> y ABCB5<sup>-</sup> clasificados. Los mAbs de control de isotipo de ratón MOPC-31C no conjugados o conjugados con FITC, Ab secundario IgG anti-ratón de cabra conjugados con FITC, mAbs CD20 anti-humano conjugado con ficoeritrina (PE), anti-humano CD31 y control de isotipo se adquirieron de PharMingen, San Diego, CA. Los mAbs secundarios conjugados con alofocianina (APC) y conjugados con PE se adquirieron de eBioscience, San Diego, CA. Los mAbs anti-humanos TIE-1 no conjugados, BMPR1a anti-humano, VE-cadherina anti-humana conjugada con PE y Nestina anti-humano fueron de R&D Systems, Minneapolis, MN. Los siguientes anticuerpos se utilizaron para la inmunohistoquímica y tinción de inmunofluorescencia de ABCB5, TIE-1 y VE-cadherina: mAb anti-ABCB5 de ratón. 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 IgG anti-ratón de caballo conjugado con HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA), Ab secundario IgG anti-ratón de conejo conjugado con FITC (ZYMED Laboratories, San Francisco, CA), Ab VE-cadherina anti-humano de conejo no conjugado (amablemente proporcionado por Cell Signaling Technology, Danvers, MA), Abs IgG de control de ratón (DAKO, Carpinteria, CA), mAb TIE-1 anti humano de conejo no conjugado (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), Ab secundario IgG anti-ratón de burro conjugado con FITC, Ab secundario IgG anti-conejo de burro conjugado con Texas Red, Ab secundario IgG anti-conejo de burro conjugado con Cy3 y Ab IgG control de conejo (todos de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).

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



Diseño y análisis de micromatrices de tejidos. La progresión del tumor melanocítico TMA es el producto de un esfuerzo conjunto de los tres Skin SPORES (Harvard, M.D. Anderson, University of Pennsylvania). Esta matriz contiene núcleos de tejido tumoral de 480 x 0,6 mm que representan cuatro tipos principales de tumores de diagnóstico: nevos benignos, melanoma cutáneo primario, metástasis ganglionares y metástasis viscerales. Se

5 recopilaron casos de los servicios de Patología de las tres instituciones participantes. Para fines de control de calidad, se eligen dos núcleos duplicados en cada una de las regiones específicas. Los nevos y los melanomas primarios tenían una o tres regiones del bloque de tejido muestreado (2 o 6 núcleos), mientras que los tumores metastásicos tenían una región muestreada de cada uno de los bloques. Por lo tanto, los 480 núcleos representan 2

10 núcleos adyacentes de 240 regiones histológicas distintas. Esta matriz incluye 130 núcleos de 35 nevos, 200 núcleos de 60 melanomas primarios y 150 núcleos de 75 lesiones metastásicas. Operacionalmente, los nevos delgados y los melanomas delgados implicaron solo a la dermis superficial/papilar, mientras que los nevos gruesos y los melanomas gruesos habían crecido para implicar a la dermis papilar y profunda (reticular). Esta matriz se construyó en el laboratorio del Dr. Mark Rubin (Departamento de Patología del Hospital Brigham and Women y Dana Farber Cancer Institute, Boston). Las secciones histológicas del portaobjetos de matriz tisular se cocieron a 58°C

15 durante 20 minutos y luego se trataron de la siguiente manera: xileno x 2 (1 hora, 10 minutos), etanol al 100% x 2 durante 2 minutos, etanol al 95% durante 2 minutos y dH<sub>2</sub>O 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 luego 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 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 luego se incubó con 5 µg/ml de mAb ABCB5 a 4°C durante la noche. El tejido se lavó luego con PBS-Tween 20 al 0,05% x 3 durante 5 minutos y luego se trató con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%/PBS durante 15 minutos. Después de enjuagar en PBS, las secciones se incubaron con Ab anti IgG de ratón de caballo biotinilado 1:200 a temperatura ambiente durante 30 minutos, se enjuagaron en PBS-tween x 3 durante 5 minutos y se incubaron con complejo de avidina-biotina-peroxidasa de rábano picante (Vector Laboratories) durante 30

20 minutos a temperatura ambiente. La inmunorreactividad se detectó utilizando el sustrato NovaRed (Vector Laboratories). Se utilizó el sistema de formación de imágenes celular automatizado Chromavision (ACIS) para cuantificar la intensidad de inmunotinción de ABCB5 y mIgGIR en la micromatriz de tejidos HTMA 84. Los valores de control de intensidad del portaobjetos (fondo más melanización intrínseca) se restaron del portaobjetos experimental y la diferencia en los valores de intensidad para cada uno de los núcleos se tomó como la tinción verdadera. Este gráfico (véase la Figura 1) muestra con un intervalo de confianza del 95% la diferencia en intensidad para cada diagnóstico de patología. Los valores de *P* entre grupos relevantes se calcularon utilizando el test *t* independiente/de muestras. El número por encima de cada barra de error muestra el número de casos dentro de cada grupo.

Análisis de citometría de flujo de la expresión de ABCB5. El análisis de la coexpresión de ABCB5 con los marcadores de superficie CD20, CD31, VE-cadherina o BMPR1a o los marcadores intracelulares Nestina o TIE-1 en suspensiones de células de melanoma derivadas de pacientes clínicos se realizó mediante citometría de flujo de dos colores tal como se describió previamente. Las células de melanoma clínico se incubaron con mAb anti-ABCB5 o con mAb de control de isotipo o sin Ab, seguido de contraste con IgG anti-ratón de burro 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 mAbs anti-CD20, anti-CD31, anti-VE-cadherina, anti-Nestina conjugados con PE o control del isotipo conjugados con PE, o mAbs control de isotipo anti-BMPR1a no conjugado, anti-TIE-1 o control del isotipo no conjugados, seguido de contraste con anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulina conjugados con PE o FITC. Se realizaron etapas de lavado con tampón de tinción o tampón de permeabilización de saponina al 1% entre cada etapa. Posteriormente se realizó una citometría de flujo de dos colores con adquisición de emisión de fluorescencia en los espectros F11 (FITC) o F12 (PE) y F14 (APC) en un Becton Dickinson FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) tal como se describe. Diferencias estadísticas en los niveles de expresión de los marcadores enumerados anteriormente por células ABCB5<sup>+</sup> y ABCB5<sup>-</sup> se determinaron utilizando el ensayo no paramétrico de Mann-Whitney. Un valor *P* de dos lados de *P* < 0,05 se consideró significativo. Células de melanoma A375 se analizaron por expresión de ABCB5 en superficie mediante incubación con mAb anti-ABCB5 o mAb control de isotipo (10 µg/ml), seguido de contraste con anticuerpo secundario de inmunoglobulina anti-ratón de cabra conjugado con FITC y citometría de flujo de un solo color (F11) como se describe.

Aislamiento celular. Se generaron suspensiones de células individuales a partir de xenoinjertos de melanoma humano tras la disección quirúrgica de tumores de ratones Balb/c NOD/SCID sacrificados o Balb/c inmunológicamente deficientes 8 semanas después de la inoculación de células tumorales. Cada uno de los tumores se cortó en trozos pequeños (aprox. de 1 mm<sup>3</sup>) y fragmentos de tumor se incubaron posteriormente en 10 ml de PBS estéril que contenía 0,1 g/L de cloruro de calcio y 5 mg/ml de Collagenase 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 eliminar el exceso de colagenasa. Células ABCB5<sup>+</sup> se aislaron por selección y positiva y poblaciones de células ABCB5<sup>-</sup> fueron generadas mediante la eliminación de células ABCB5<sup>+</sup> utilizando marcaje del mAb anti-ABCB5 y clasificación de células de perlas magnéticas tal como se describe. Brevemente, se marcaron células de melanoma G3361 o A375 humanas o suspensiones de células individuales derivadas de xenoinjertos de melanoma humano o muestras clínicas de melanoma con mAb anti-ABCB5 (20 µg/ml) durante 30 min a 4°C, se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpos, seguido de incubación con micropellets magnéticas recubiertas de mAb IgG anti-ratón secundarias

(Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y posterior separación celular de doble paso en columnas de separación MiniMACS (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. La pureza de aislados celulares ABCB5<sup>+</sup> y células de melanoma G3361 humanas ABCB5<sup>-</sup> se analizaron mediante análisis de citometría de flujo de expresión de ABCB5 (F11) en una máquina FACSCalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) después de la incubación con mAb anti-ABCB5 conjugado con FITC, seguido de incubación de microperlas recubiertas con mAb IgG anti-ratón y clasificación de células magnéticas. Se determinaron las diferencias estadísticas en la expresión de ABCB5 entre células de melanoma G3361 no segregadas, ABCB5<sup>+</sup> y ABCB5<sup>-</sup> humanas utilizando ANOVA de una vía, seguido de la corrección de Bonferroni. Un valor *P* de dos lados de *P* <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

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

Xenotrasplante de melanoma humano. Células de melanoma G3361 humanas ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup>, no reguladas (10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> o 10<sup>5</sup>/inóculo, respectivamente), o A375 humanas (2 x 10<sup>6</sup>, 2 x 10<sup>5</sup> o 2 x 10<sup>4</sup>/inóculo, respectivamente), o células de melanoma derivadas de pacientes clínicas (10<sup>6</sup>/inóculo, respectivamente), o células ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup> aisladas de xenoinjertos de tumores primarios G3361 derivadas de ABCB5<sup>+</sup> (10<sup>7</sup>/inóculo, respectivamente) se inyectaron s.c. uni- o bi-lateralmente en los flancos de ratones Balb/c NOD/SCID receptores. La formación/el crecimiento del tumor se analizó semanalmente como un ciclo temporal, al menos hasta el punto final de 8 semanas, a menos que el tamaño excesivo del tumor requiriera una eutanasia estipulada por protocolo antes, mediante la determinación del volumen del tumor (TV) de acuerdo con la fórmula establecida [TV (mm<sup>3</sup>) = π / 6 x 0.5 x longitud x (anchura)<sup>2</sup>]. Con respecto a la formación de tumores, los ratones se consideraron negativos para el tumor si no se identificaron tejidos tumorales en la necropsia. Las diferencias estadísticamente significativas en la formación de tumores primarios y secundarios se evaluaron mediante el ensayo exacto de Fisher. Las diferencias en los volúmenes de los tumores se determinaron utilizando un ANOVA de una vía, seguido de la corrección de Bonferroni o el ensayo de Kruskal-Wallis, seguido de la corrección de Dun, con valores de *P* de dos colas <0,05 considerados significativos.

Seguimiento in vivo del linaje genético. Poblaciones de células tumorales G3361 humanas ABCB5<sup>+</sup>/DsRed2 y ABCB5<sup>-</sup>/EYFP, generadas utilizando la clasificación de células de perlas magnéticas como se indica arriba, se reconstituyeron a relaciones de abundancia relativa de 1 x 10<sup>6</sup> y 9 x 10<sup>6</sup> células, respectivamente, seguido de la determinación de las relaciones de células resultantes en inóculos mediante citometría de flujo de doble color (gráficos F11 (EYFP) frente a F12 (DsRed2)) antes del xenotrasplante. Co-cultivos de G3361/DsRed2 y G3361/EYFP se inyectaron s.c. (10<sup>7</sup> células/inóculo) en el flanco derecho de ratones Balb/c NOD/SCID receptores. A las 4 o 6 semanas post-xenotrasplante se recogieron tumores y suspensiones de células individuales o secciones de tejido congelado preparadas como anteriormente, para la determinación de la abundancia relativa *in vivo* de células de melanoma DsRed2<sup>+</sup> y EYFP<sup>+</sup> mediante citometría de flujo de doble color o microscopía de fluorescencia de suspensiones de células individuales derivadas de tumores (tras la unión en placas de cultivo de tejidos adherentes), y para el análisis de secciones de tejido congelado de 5 μm mediante microscopía de fluorescencia. En experimentos adicionales, la abundancia relativa de células de melanoma DsRed2<sup>+</sup> y EYFP<sup>+</sup> se determinó en subconjuntos de células derivadas de xenoinjertos ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup> por citometría de flujo de dos colores como arriba y los porcentajes de células tumorales DsRed2<sup>+</sup> y EYFP<sup>+</sup> se compararon estadísticamente utilizando el test *t* de Student no apareado, con un valor de *P* bilateral de *P* <0,05 considerado estadísticamente significativo.

Fijación como objetivo de mAb anti-ABCB5. Células de melanoma humano G3361 no segregadas fueron xenoinjertadas s.c. en ratones Balb/c inmunológicamente deficientes (10<sup>7</sup>/inóculo). A los animales se les inyectó i.p. mAb anti-ABCB5 (clon 3C2-1D12), mAb control de isotipo (500 μg/inyección) bi-semanalmente o ningún Ab comenzando 24 h antes del xenotrasplante de melanoma. El crecimiento del tumor se analizó cada dos semanas como un curso en el tiempo mediante la determinación del volumen del tumor (TV) tal como se describió arriba. Las diferencias en los volúmenes del tumoral se determinaron utilizando ANOVA no paramétrico de una vía (ensayo de Kruskal-Wallis), seguido de la corrección de Dun para la comparación de los tres grupos experimentales, con valores *P* de dos colas <0,05 considerados significativos. Para la determinación de la eficacia de unión de mAb anti-ABCB5 administrado *in vivo* a xenoinjertos de melanoma de ser humano a ratón inmunológicamente deficiente establecidos, suspensiones de células individuales y secciones congeladas se generaron a partir de xenoinjertos de melanoma 24 horas después de la administración i.p. de mAb anti-ABCB5, mAb de control de isotipo IgG1k murino o ningún tratamiento. Las suspensiones de células individuales preparadas se incubaron posteriormente con Ab secundario Ig anti-ratón de cabra conjugado con FITC durante 30 min a 4°C y se analizaron mediante citometría de flujo de color único tal como arriba, y las secciones congeladas se incubaron con Ab Ig anti-ratón de caballo conjugado con HRP y se analizaron como arriba.

Evaluación de ADCC y CDC. ADCC o CDC se determinaron mediante citometría de flujo de doble color tal como se describe previamente. Brevemente, suspensiones de células de melanoma G3361 humanas en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) libres de suero (BioWhittaker, Walkersville, MD) se marcaron con 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina (DiO) (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células de melanoma marcadas con DiO se sembraron entonces a una densidad de 300,000 células por pocillo en

placas de cultivo de 6 pocillos de fondo plano en 3 ml y se cultivaron en medio estándar en una incubadora humidificada durante la noche. Después de ello, las células diana de melanoma marcadas con DiO se pre-incubaron en presencia o ausencia de anti-ABCB5 o mAbs isotipo de control (20 µg/ml, respectivamente) durante 30 min a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se co-cultivaron durante 24 horas adicionales a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con o sin esplenocitos efectores de ratón Balb/c inmunológicamente deficiente, recientemente aislados (12 x 10<sup>6</sup> células/pocillo, relación de células diana a efectoras 1:40) para la evaluación de ADCC, o en presencia o ausencia de suero de ratón Balb/c inmunológicamente deficiente al 5% para la determinación de CDC. Posteriormente, las células y sus sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante citometría de flujo de doble color en una máquina FACSCalibur (Becton Dickinson) inmediatamente después de la adición de 10 µg/ml de yoduro de propidio (PI) (Sigma, Milwaukee, WI), con células diana lisadas reconocidas por un fenotipo DiO<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>. Los niveles de ADCC para los tres grupos de tratamiento se calcularon de la siguiente manera: [ADCC (%) = (DIO<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> porcentaje de positividad de la muestra) - (DIO<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> no tratado medio porcentaje de positividad de la muestra)]. Las diferencias en los niveles de ADCC se determinaron utilizando ANOVA no paramétrico de una vía (ensayo de Kruskal-Wallis), seguido de la corrección de Dun, con valores *P* de dos colas <0,05 considerados significativos.

Mediciones de la viabilidad celular. La viabilidad celular se midió en inóculos de células tumorales antes del xenotrasplante utilizando tinción de calceína-AM. Brevemente, 1 x 10<sup>6</sup> células de melanoma ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup> no segregadas se incubaron con calceína-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 30 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la absorción del sustrato y la activación enzimática del derivado fluorescente. Posteriormente, las células se lavaron y las mediciones de fluorescencia se adquirieron mediante citometría de flujo en el espectro de emisión F12 en un Becton Dickinson FACScan. Las células que exhiben la generación del derivado de calceína-AM fluorescente en comparación con las muestras no expuestas se consideraron viables. La viabilidad celular también se determinó en todas las muestras utilizando el método de exclusión con colorante azul tripán.

Extracción de ARN y PCR-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 estándares se realizaron utilizando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript para la PCR de transcripción inversa (Invitrogen) tal como se describió previamente. ARN total preparado a partir de 8 líneas celulares 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 bajo condiciones y con números de paso como se describió anteriormente fue proporcionado por el Programa Terapéutico del Desarrollo NCI/NIH. La PCR de transcripción reversa cuantitativa en tiempo real para la expresión del gen ABCB5 relativo se realizó como se describió previamente. La expresión de ABCB5 se evaluó mediante la relación del nivel de expresión en la muestra frente a la expresión media en todas las muestras, en *n* = 3 experimentos independientes. Los datos de crecimiento (tiempo de duplicación del cultivo) para las 8 líneas celulares de melanoma humano del panel NCI-60 fueron los obtenidos por el Instituto Nacional del Cáncer, que se pueden encontrar en línea ([http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common\\_files/cell\\_list.html](http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common_files/cell_list.html)). La cinética de crecimiento para las líneas celulares de melanoma G3361 y A375 se estableció en el laboratorio de los autores de la invención mediante recuento celular de acuerdo con la fórmula: tiempo de duplicación de la población (h) = T2 - T1 / (log<sub>2</sub> (recuento de células<sub>T2</sub> / recuento de células<sub>T1</sub>)), en donde T2 y T1 representan dos instantes distintos (h) en la fase de crecimiento del cultivo logarítmica. Se realizó una correlación lineal de la expresión relativa del ARNm de ABCB5 y tiempos de duplicación del cultivo (h) y se calculó un coeficiente de correlación de Pearson y se utilizaron los criterios de *P* < 0,05 y *r* > 0,3 o *r* < -0,3 para identificar correlaciones significativas tal como se describió previamente.

#### Ejemplo 1

Los autores de la invención examinaron primero la relación de ABCB5 a la progresión clínica de melanoma maligno, debido a su estrecha asociación con CD166, un marcador de enfermedad más avanzada. Esto se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica ABCB5 y análisis de imágenes cuantitativas de una micromatriz de tejido de progresión de melanoma establecido (TMA) que contiene 480 núcleos de tejido de melanoma derivados de paciente (0,6 mm), que representan cuatro tipos principales de tumores diagnósticos: nevos melanocíticos benignos, melanoma cutáneo primario, metástasis de melanoma a los ganglios linfáticos y metástasis de melanoma a las vísceras (Figura 1a). Encontraron que los melanomas primarios o metastásicos expresaban significativamente más ABCB5 que los nevos melanocíticos benignos (*P* < 0,001), los melanomas primarios gruesos expresaban más ABCB5 que los melanomas primarios finos (*P* = 0,004) y los melanomas metastásicos a los ganglios linfáticos expresaban más ABCB5 que las lesiones primarias (*P* = 0,001), identificando ABCB5 como un nuevo marcador molecular de progresión neoplásica en melanoma maligno humano. Se observó una heterogeneidad aparente en la expresión de ABCB5 en metástasis, con una mayor tinción en los ganglios linfáticos que en las metástasis viscerales (*P* = 0,025).

#### Ejemplo 2

Cuando se analizó mediante citometría de flujo en suspensiones de células individuales recién derivadas de una serie más pequeña de melanomas clínicos disecados quirúrgicamente (*n* = 6 pacientes, Tabla 1), también se encontró que ABCB5 se expresaba consistentemente en 6 de 6 muestras, oscilando la frecuencia de células tumorales ABCB5<sup>+</sup> entre 1,6 y 20,4% (9,2 ± 3,2%, media ± SEM) (Figura 1b, Tabla 1). La caracterización fenotípica adicional con respecto a los antígenos asociados con un fenotipo molecular más primitivo reveló una expresión

significativa de CD20 en 3 de 6 muestras (frecuencia en todas las muestras:  $0,3 \pm 0,2\%$ , media  $\pm$  SEM), 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 estromal CD31 en 5 de 6 muestras ( $0,8 \pm 0,4\%$ ) (Figura 1b). La expresión preferencial por ABCB5<sup>+</sup> en comparación con subpoblaciones de ABCB5<sup>-</sup>, tal como se identificó previamente para el determinante de células madre CD133, se demostró en las muestras que expresan los respectivos marcadores de nestina ( $49,4 \pm 6,6\%$  frente a  $26,6 \pm 4,9\%$ , respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $P = 0,026$ ), TIE-1 ( $59,4 \pm 7,8\%$  frente a  $23,8 \pm 7,5\%$ ,  $P = 0,015$ ), VE-cadherina ( $6,4 \pm 1,2\%$  frente a  $0,1 \pm 0,1\%$ ,  $P = 0,029$ ) y BMPR1a ( $37,0 \pm 4,4\%$  frente a  $2,0 \pm 0,2\%$ ,  $P = 0,002$ ), pero no para CD20 ( $0,2 \pm 0,2\%$  frente a  $1,1 \pm 0,7\%$ , NS) o CD31 ( $2,4 \pm 1,2\%$  frente a  $0,5 \pm 0,3\%$ , NS) (Figura 1c). La inmunohistoquímica in situ reveló células individuales o racimos de células ABCB5<sup>+</sup> para explicar una subpoblación minoritaria dentro de tumores clínicos con células teñidas positivamente que se correlacionan predominantemente con regiones no diferenciadas no melanizadas o expresión de TIE-1, y zonas no reactivas correspondientes a zonas más diferenciadas y melanizadas.

La Tabla 1 resume las características de los tumores de seis pacientes con un sitio de melanoma (ya sea una metástasis o recidiva primaria). Los tumores se cuantifican por % de ABCB5<sup>+</sup> presente. También se muestra un resumen de los resultados (número de ratones con tumores) para nueve grupos de ratones NOD/SCID que fueron trasplantados con inóculos de replicación ( $n = 2-10$ ) no segregados, células de melanoma humano ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup>.

**Tabla 1** | **Paciente y características del tumor**

Paciente nº	Sitio del melanoma	ABCB5 <sup>+</sup> en tumor (%)	Número de ratones trasplantados con tumores		
			No segregados	ABCB5 <sup>-</sup>	ABCB5 <sup>+</sup>
P 1	Metástasis	8,5	0/2	0/2	2/2
P 2	Metástasis	1,6	1/2	0/2	2/2
P 3	Metástasis	3,2	5/5	1/5	5/5
P 4	Metástasis	20,4	N/D	N/D	N/D
P 5	Metástasis	17,4	N/D	N/D	N/D
P 6	Primario	4,2	N/D	N/D	N/D

Ejemplo 3

Para determinar si el subconjunto de células de melanoma definido por ABCB5 se enriqueció para MMIC, los autores de la invención compararon las capacidades de células de melanoma purificadas en ABCB5<sup>+</sup> (ABCB5<sup>+</sup>) frente a agotadas en ABCB5<sup>-</sup> (ABCB5<sup>-</sup>) para iniciar la formación del tumor *in vivo*, utilizando ya sea cultivos de melanoma humano cutáneos *clonales* establecidos (G3361: 2-10% de positividad para ABCB5; A375: 1-10% de positividad, Figura 5a) o células de melanoma recientemente *derivadas del paciente* (Figura 1b, Tabla 1) en seres humanos a experimentos de xenotrasplante de tumor de ratón NOD/SCID. Grupos de ratones NOD/SCID fueron trasplantados con inóculos de replicación ( $n = 2-10$ ) de células de melanoma humano, ABCB5 o ABCB5<sup>-</sup> no segregados en un intervalo de log veces a partir de dosis de células incapaces de iniciar de manera eficiente el crecimiento del tumor (G3361:  $10^5$  células, A375:  $2 \times 10^4$  células) a dosis que iniciaron la formación tumoral consistentemente cuando se utilizaron células ABCB5<sup>+</sup> (células G3361:  $10^7$ , A375:  $2 \times 10^6$  células, aislados recientes de pacientes:  $10^6$  células). La viabilidad celular determinada por tinción con calceína-AM excedió el 90% en todos los inóculos de células tumorales y no difirió significativamente entre los aislados (Figura 5b).

De los 22 ratones agregados a los que se les inyectó células de melanoma G3361 ABCB5<sup>-</sup>, solo 1 ratón trasplantado con la dosis celular más alta generó un tumor (Figura 2a, panel izquierdo). Por el contrario, 13 de 20 a los que se inyectaron células ABCB5<sup>+</sup> formaron tumores ( $P < 0,0001$ ), incluidos todos los ratones a los que se inyectó la dosis celular más alta (Figura 2a, panel izquierdo, valores de  $P$  adicionales para las comparaciones individuales específicas para la dosis proporcionadas en la figura), indicando un enriquecimiento  $> 2$  log veces para MMIC en este subconjunto de células, según se determina por comparación de dosis de inóculo requeridas para el 50% de formación de tumor (TF<sub>50</sub>) (Figura 2a, panel central).

De manera similar, de 21 ratones agregados a los que se inyectaron células de melanoma A375 ABCB5<sup>-</sup>, solo 8 ratones desarrollaron un tumor, mientras que 16 de 22 ratones a los que se inyectaron células ABCB5<sup>+</sup> formaron tumores ( $P < 0,05$ ), lo que indica un enriquecimiento  $> 1$  log para MMIC entre células A375 ABCB5<sup>+</sup> (Figura 2b, paneles izquierdo y central). La purificación de células ABCB5<sup>+</sup> dio como resultado un enriquecimiento de 19,8 veces la frecuencia de células ABCB5<sup>+</sup> de  $5,0 \pm 0,4\%$  en cultivos no segregados a  $98,8 \pm 0,8\%$  (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ,  $P < 0,001$ ) cuando se analizaron muestras representativas utilizando células de melanoma G3361, y el agotamiento en ABCB5<sup>+</sup> resultó en una reducción de 4,75 veces la frecuencia de células ABCB5<sup>+</sup> de  $5,0 \pm 0,4\%$  a  $1,1 \pm 0,3\%$  (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ,  $P < 0,001$ ) (Figura 5c). Esta contaminación residual (22% de la frecuencia de ABCB5<sup>+</sup> que se produce de forma natural) con células ABCB5<sup>+</sup> puede explicar la formación de tumores observada por inóculos de ABCB5<sup>-</sup> en las dosis más altas, y sugiere una posible subestimación del enriquecimiento de MMIC entre las poblaciones de ABCB5<sup>+</sup>. En particular, en aquellos casos en los que la formación de tumores se producía como resultado de ABCB5<sup>-</sup>, la inyección de células a las dosis de células más altas, se encontró que los tumores eran constantemente más pequeños que los resultantes de xenoinjertos ABCB5<sup>+</sup> (G3361: Volumen del tumor (TV) =  $15 \pm 15$  frente a  $286 \pm$

90 mm<sup>3</sup>, respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $P < 0,01$ ; A375: TV = 239  $\pm$  70 frente a 832  $\pm$  121 mm<sup>3</sup>, respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $P < 0,05$ ) (Figuras 2a y 2b).

Los xenoinjertos de cultivo de melanoma fueron heterogéneos y comprendían células ABCB5<sup>+</sup> que se correlacionaban predominantemente con regiones no melanizadas y expresión de VE-cadherina, y zonas ABCB5<sup>-</sup> correspondientes a áreas melanizadas (Figura 2c). Células ABCB5<sup>+</sup> re-purificadas de tumores primarios derivados de ABCB5 formaban tumores secundarios más eficientemente que sus homólogos ABCB5<sup>-</sup> en 11 de 11 frente a 7 de 12 receptores, respectivamente ( $P = 0,037$ ) (Figura 2d) y restableció la heterogeneidad del tumor primario. Consistente con los resultados obtenidos utilizando sistemas modelo de melanoma clonales, solo 1 de 9 ratones receptores a los que se inyectaron 10<sup>6</sup> células de melanoma ABCB5<sup>-</sup> recientemente derivadas del paciente desarrollaron un tumor, mientras que todos los 9 receptores de 10<sup>6</sup> células de melanoma ABCB5<sup>+</sup> formaron tumores ( $P < 0,001$ ), siendo la TV medio menor en los receptores de ABCB5<sup>-</sup> frente a inóculos ABCB5<sup>+</sup> (TV = 2  $\pm$  2 frente a 35  $\pm$  11 mm<sup>3</sup>, respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $P < 0,01$ ) (Figura 2e, Tabla 1). Los tumores generados a partir de células de melanoma ABCB5<sup>+</sup> restablecieron la heterogeneidad del tumor que se produce de forma natural con respecto a la expresión de ABCB5, según lo determinado por inmunohistoquímica y citometría de flujo de muestra tumoral disociada, oscilando una positividad ABCB5 entre 2 y 8% (resultados no ilustrados). Estos hallazgos establecen que la frecuencia MMIC está marcadamente enriquecida en la población minoritaria de melanoma definida por ABCB5.

#### Ejemplo 4

Para examinar directamente las contribuciones de crecimiento relativo del tumor de subpoblaciones ABCB5<sup>+</sup> y ABCB5<sup>-</sup> *co-xenoinjertadas*, y para investigar adicionalmente la capacidad de auto-renovación y diferenciación de ABCB5<sup>+</sup>, los autores de la invención aislaron células de melanoma ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup> de variantes de la línea celular G3361 transfectadas establemente que expresan proteína fluorescente roja (DsRed2) o proteína fluorescente amarilla-verde potenciada (EYFP), respectivamente, un sistema modelo diseñado en su laboratorio para permitir el seguimiento del linaje genético *in vivo*. Encontraron que los xenotrasplantes de co-cultivos G3361/DsRed2 ABCB5<sup>+</sup> y transfectados con fluorocromos G3361/EYFP ABCB5<sup>-</sup> se reconstituyeron a 14,0  $\pm$  3,0% y 86,0  $\pm$  3,0% de abundancia relativa (media  $\pm$  DE,  $n = 6$ ), respectivamente, a ratones NOD/SCID dieron como resultado frecuencias relativas de células tumorales DsRed2<sup>+</sup> de origen ABCB5<sup>+</sup> dependientes del tiempo y de incremento en serie (pendiente de regresión lineal 6,4  $\pm$  1,0,  $P < 0,0001$ ) en tumores experimentales en comparación con inoculados, de hasta una frecuencia de 51,3  $\pm$  1,4% en el punto final experimental de 6 semanas (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ,  $P = 0,024$ ) (Figuras 3a, 3b y 3c, paneles superior e inferior). Estos hallazgos establecen una mayor tumorigenicidad de poblaciones de melanoma a granel ABCB5<sup>+</sup> frente a ABCB5<sup>-</sup> *co-xenoinjertadas* en un modelo competitivo de desarrollo tumoral. De manera importante, estos resultados indican, además, que las células iniciadoras de tumores pueden conducir a poblaciones en masa de cáncer más diferenciadas y por sí mismas *no tumorigénicas* también, aunque de manera menos eficiente, contribuyen a una masa tumoral creciente. Los tumores experimentales también contenían células de melanoma DsRed2/EYFP doble positivas (Figura 3c, paneles centrales), lo que indica que las células tumorales derivadas de ABCB5<sup>+</sup>, al igual que los progenitores de piel fisiológicos ABCB5<sup>+</sup> (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)), participan en la fusión celular con subconjuntos ABCB5<sup>-</sup>.

#### Ejemplo 5

Cuando células de melanoma ABCB5<sup>+</sup> se purificaron a partir de tumores experimentales resultantes del co-xenotrasplante de 10% de G3361/DsRed2 ABCB5<sup>+</sup> y 90% de transfectantes de fluorocromo G3361/EYFP ABCB5<sup>-</sup>, los autores de la invención encontraron que 92,9  $\pm$  6,4% (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ) de células fluorescentes eran de fenotipo DsRed2<sup>+</sup> (origen ABCB5<sup>+</sup>) (Figura 3d, panel superior izquierdo), demostrando la capacidad de autorrenovación de este subconjunto de células. Las células EYFP<sup>+</sup> no se encontraron en niveles significativos (7,1  $\pm$  6,4%, media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ) entre aislados ABCB5<sup>+</sup>, y la baja frecuencia observada fue totalmente explicada en magnitud por la contaminación residual de células ABCB5<sup>+</sup> entre poblaciones EYFP<sup>+</sup> ABCB5<sup>-</sup> *co-* injertadas (1,1% de 90% de células EYFP<sup>+</sup> = 0,99% frente a 10% células DsRed2<sup>+</sup> ABCB5<sup>+</sup> en inóculos), lo que indica que las células tumorales ABCB5<sup>+</sup> surgieron solo de inóculos ABCB5<sup>+</sup> y que las células ABCB5<sup>-</sup> dan lugar exclusivamente a progenie ABCB5<sup>-</sup>. Además de ello, aislados de células tumorales ABCB5<sup>-</sup> fluorescentes exhibieron 52,5  $\pm$  0,8% (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ) de positividad DsRed2 (origen ABCB5<sup>+</sup>) y 47,5  $\pm$  0,8% de positividad EYFP (origen ABCB5<sup>-</sup>) (Figura 3d, panel inferior izquierdo), demostrando que las células de melanoma ABCB5<sup>+</sup> poseen la capacidad de diferenciarse y de dar lugar a poblaciones tumorales ABCB5<sup>-</sup>. Estos hallazgos muestran la existencia de una jerarquía de tumores en la que células de melanoma ABCB5<sup>+</sup>, enriquecidos para MMIC, se auto-renuevan y dan lugar a una progenie tumoral ABCB5<sup>-</sup> más diferenciada.

#### Ejemplo 6

Con el fin de diseccionar mecánicamente si la población minoritaria definida por ABCB5 y enriquecida en MMIC, es necesaria para la tumorigenicidad cuando se xenoinjertan *poblaciones en masa tumorales no segregadas*, se examinó si el exterminio selectivo de este subconjunto celular puede inhibir el crecimiento y la formación de tumores.

Un marcador molecular prospectivo de células iniciadoras de tumores no ha sido fijado como objetivo hasta la fecha para la inhibición *in vivo* del crecimiento del tumor. Los autores de la invención administraron un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido a ABCB5 en un modelo de xenoinjerto de melanoma de ser humano a ratón inmunológicamente deficiente, porque los ratones inmunológicamente deficientes, a diferencia de NOD/SCID, son capaces de exterminar células tumorales mediadas por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Se xenoinjertaron s.c. células de melanoma en ratones Balb/c inmunológicamente deficientes receptores, a los animales se les inyectó i.p. mAb anti-ABCB5 o mAb control cada dos semanas, comenzando 24 h antes del xenotrasplante de melanoma, y la formación y el crecimiento de tumores se evaluaron en serie mediante mediciones de TV como un curso en el tiempo. La administración de mAb anti-ABCB5 dio como resultado un crecimiento del tumor significativamente inhibido en comparación con el determinado en ratones tratados con mAb control o no tratados en el transcurso de un período de observación de 58 días (TV media en el punto final de 58 días para el tratado con mAb anti-ABCB5 ( $n = 11$  ratones, ninguna muerte durante el período de observación) frente a tratado con mAb de control ( $n = 10$  ratones, excluyendo 1 muerte durante el período de observación) o sin tratar ( $n = 18$  ratones, excluyendo 1 muerte durante el período de observación):  $23 \pm 16$  frente a  $325 \pm 78 \text{ mm}^3$ ,  $P < 0.01$ , o frente a  $295 \pm 94 \text{ mm}^3$ ,  $P < 0.001$ , media  $\pm$  SEM, respectivamente) (Figura 4a). El tratamiento con mAb de control no mostró diferencias significativas en el crecimiento del tumor en comparación con ningún tratamiento (Figura 4a). El tratamiento con mAb anti-ABCB5 también inhibió significativamente *la formación del tumor* evaluada a los 58 días después del xenotrasplante de células de melanoma, detectándose tumores solo en 3 de 11 ratones tratados con mAb anti-ABCB5, frente a 10 de 10 ratones control tratados con mAb y 18 de 18 animales control no tratados ( $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente) (Figura 4b).

#### Ejemplo 7

Los xenoinjertos de melanoma humano cultivados en ratones inmunológicamente deficientes no tratados, como los receptores NOD/SCID, muestran una heterogeneidad de los tumores y comprenden una población minoritaria de células ABCB5<sup>+</sup> que se correlacionan predominantemente con regiones indiferenciadas, no melanizadas, y zonas ABCB5<sup>-</sup> correspondientes a áreas diferenciadas y melanizadas (Figura 4c). El análisis de la eficacia de unión *in vivo* reveló que el mAb anti-ABCB5 administrado sistémicamente, pero no el mAb de control, se unía a un subconjunto de células tumorales en xenoinjertos de melanoma establecidos (Figura 4d) consistente en magnitud con el subconjunto de células tumorales ABCB5<sup>+</sup> (Figura 4c), como se determinó cuantitativamente en suspensiones de células derivadas de xenoinjertos mediante citometría de flujo (Figura 4d), y también mediante inmunohistoquímica mediante la detección de racimos celulares con tinción positiva.

#### Ejemplo 8

Para determinar el mecanismo de la inhibición de la formación y el crecimiento del tumor mediado por mAb anti-ABCB5, se evaluaron las respuestas efectoras inmunes ADCC y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante citometría de flujo de doble color tal como se describió previamente. Cultivos diana de melanoma tratados con mAb anti-ABCB5, tratados con mAb de control o no tratados se marcaron con el colorante de membrana fluorescente verde DiO y se contrastaron con yoduro de propidio rojo fluorescente (PI, al que solo células lisadas son permeables), después de co-cultivo con células inmunes efectoras no marcadas o suero derivado de bazos de ratón Balb/c inmunológicamente deficiente. El mAb anti-ABCB5, pero no el mAb control de isotipo indujo significativamente la muerte de células diana del melanoma mediada por ADCC ( $2,1 \pm 0,4\%$  frente a  $0,2 \pm 0,2\%$ , respectivamente,  $P < 0,05$ ) en una subpoblación de melanoma comparable en tamaño al 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 DiO/PI dobles positivas (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 muerte celular significativa alguna en comparación con los controles (resultados no ilustrados), sugiriendo que CDC o los efectos de mAb tóxicos directos no son las causas importantes de la inhibición del tumor en este sistema experimental.

Los efectos de la fijación como objetivo de ABCB5 en xenoinjertos de melanoma de ser humano a ratón inmunológicamente deficiente *establecidos* ( $n = 13$  derivados de tres pacientes distintos y  $n = 10$  derivados de cultivos de melanoma establecidos), fueron examinados con el fin de testar la hipótesis de que la selección negativa para MMIC vía ablación de células ABCB5<sup>+</sup> mediada por ADCC inhibe el crecimiento del tumor. Este resultado se observaría en una situación dinámica *in vivo* si el subconjunto de melanoma ABCB5<sup>+</sup> es crítico para la tumorigénesis robusta.

Se llevó a cabo la caracterización de células de melanoma humano ABCB5<sup>+</sup> o ABCB5<sup>-</sup> utilizadas en experimentos de xenotrasplante. La administración de mAb anti-ABCB5 *in vivo*, iniciada 14 días después de la inoculación de células tumorales cuando se establecieron xenoinjertos (día 0), anuló el crecimiento del tumor significativo observado en grupos tratados con mAb control de isotipo o no tratados en el transcurso de un período de tratamiento de 21 días ( $P < 0,001$  y  $P < 0,001$ , respectivamente) e inhibió significativamente el volumen medio del tumor en comparación con el determinado en ratones control tratados con mAb o ratones no tratados (TV para tratados con mAb anti-ABCB5 ( $n = 23$  ratones) frente a tratados con mAb de control ( $n = 22$  ratones) o frente a no

5 tratados ( $n = 22$  ratones):  $32,7 \pm 9,4$  frente a  $226,6 \pm 53,8$  mm<sup>3</sup>,  $P < 0,001$ , o frente a  $165,4 \pm 36,9$  mm<sup>3</sup>, respectivamente, media  $\pm$  s.e.m.,  $P < 0,01$ ). Los efectos inhibidores del mAb ABCB5 también fueron estadísticamente significativos cuando los subconjuntos de tumores de xenoinjerto de melanoma recientemente derivados del paciente se analizaron de forma independiente, anulando el crecimiento del tumor significativo observado en grupos  
 10 tratados con mAb control del isotipo o no tratados ( $P < 0,05$  y  $P < 0,001$ , respectivamente) e inhibió significativamente la TV media en comparación con la determinada en ratones tratados con mAb de control o no tratados (tratados con mAb anti-ABCB5 ( $n = 13$  ratones) frente a tratados con mAb de control ( $n = 12$  ratones) o frente a no tratados ( $n = 12$  ratones):  $29,6 \pm 9,2$  frente a  $289,2 \pm 91,8$  mm<sup>3</sup>,  $P < 0,05$ , o frente a  $222,9 \pm 57,5$  mm<sup>3</sup>, respectivamente, media  $\pm$  s.e.m.,  $P < 0,001$ ). El tratamiento con mAb de control no mostró efectos significativos sobre el crecimiento del tumor o el volumen del tumor en comparación con ningún tratamiento en ninguno de los grupos analizados. Los animales fueron sacrificados tras el intervalo de tratamiento según se requiere por el protocolo animal experimental aplicable debido a la carga tumoral y el estado de enfermedad en los grupos de control del tumor derivados de pacientes (TV medida máxima:  $971,5$  mm<sup>3</sup>).

15 El análisis inmunohistoquímico de xenoinjertos de melanoma derivados de pacientes tratados con mAb anti-ABCB5 reveló sólo pequeños focos de expresión ABCB5 (en general  $< 1\%$  de las células) que corresponde a mAb anti-ABCB5 unido *in vivo* en una sección adyacente. Una sección adyacente adicional teñida para CD11b reveló la infiltración de macrófagos correspondiente con regiones de localización del mAb anti-ABCB5, que con frecuencia limita zonas de degeneración celular y necrosis. En contraposición, el control de xenoinjertos tratados con mAb reveló 10-15% de células ABCB5-reactivas, mAb anti-Ig secundario falló para localizar a las regiones respectivas en una sección adyacente, pero detectó regiones de inmunoglobulina murina intravascular, y macrófagos CD11b+ falló para infiltrarse en el tejido del tumor. Se observaron efectos similares en xenoinjertos de melanoma derivados de la línea celular, con necrosis tumoral potenciada en animales tratados con mAb anti-ABCB5 frente a animales tratados con mAb de control del isotipo (30-40% frente a  $< 5\%$  de células necróticas, respectivamente). Estos hallazgos apoyan adicionalmente la noción de que para la tumorigenicidad se requiere la población minoritaria definida para ABCB5-enriquecida en MMIC.

25 Se realizó la caracterización de xenoinjertos de melanoma G3361 a ratones Balb/c inmunológicamente deficientes. Se segregaron regiones ABCB5+ con áreas no melanizadas, mientras que las regiones ABCB5- se correlacionan con las regiones que muestran melanización pardo-negra en partículas. 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 consistentes a los arriba descritos. Como en los xenoinjertos primarios derivados de pacientes, el análisis inmunohistoquímico de secciones de tumores adyacentes reveló que el mAb anti-ABCB5 administrado sistémicamente se unía a las regiones tumorales ABCB5+, que también se correlacionaba con la infiltración de células CDR11b+. También se detectaron áreas raras de expresión de ABCB5 a las que el anticuerpo administrado *in vivo* no pudo localizar y en las que las células CD11b positivas no se pudieron infiltrar.

### 35 Ejemplo 9

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

1. Secuencia de ADN de HC de longitud completa, incluida la secuencia señal (subrayada)

ATGGACTTTGGGCTGAGCTTGGTTTTCCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAG  
TGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAA  
GCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACTATTACATGTATTGGGTTCGTC  
 AGACTCCGAAAAGAGGGCTGGAGTGGGTCGCCACCATTAATGATGGCGGTACTCACACC  
 TACTATCCAGACAGTCTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAT  
 CCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGATGTCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGCAA  
 GAGATGATTATTACTACGGTAGTCACTTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC  
 TCAGTACCCTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC  
 CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC  
 CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC  
 CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC  
 CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCA  
 AAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCCTG  
 CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGA  
 CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG  
 AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG  
 ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCCAGCGTCTCACCCT  
 CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCC  
 TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG  
 GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG  
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC  
 CGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC  
 TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC  
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
 GTAAATGA SEQ ID NO: 17

2. Secuencia de ADN de LC de longitud completa, incluida la secuencia señal (subrayada)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC  
ACTGTTGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG  
GGCCACCATCTCATAAGGGCCAGCAAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATATGC  
ACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAAC  
CTAGAATCTGAGGTCCCTGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCT  
CAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGG  
AGCTTACAGTTCGGAGGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT  
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACG  
CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC  
TACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA  
CGCCTCGGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGG  
GAGAGTGTGA SEQ ID NO: 18

3. Secuencia de ADN de VR HC, incluidos las CDRs (subrayadas)

GAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTG  
 5 AAGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACTATTACATGTATTGGGTTCG

TCAGACTCCGAAAAGAGGGCTGGAGTGGGTCGCCACCATTAATGATGGCGGTACTCACA  
CCTACTATCCAGACAGTCTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC  
ATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGATGTCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGC  
AAGAGATGATTATTACTACGGTAGTCACTTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA  
CCTCAGTACCCTCTCCTCA SEQ ID NO: 9

4. Secuencia de ADN de VR LC, incluidos las CDRs (subrayadas)



GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGG  
 GCCACCATCTCATA CAGGGCCAGCAAAAAGTGT CAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCA  
 CTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACC  
 TAGAATCTGAGGTCCCTGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTC  
 AACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGA  
 GCTTACACGTTCCGGAGGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG SEQ ID NO: 10

5. Secuencia de aminoácidos de VR HC, incluidas las regiones marco (F1, F2, F3 y F4) y las CDRs (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) tal como se marca. Las regiones de marco 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 DYYMY

HC-F2 CDR-H2 HC-F3  
 WVRQTPPEKRLEWVA TINDGGTHY YPDSLKGRFTISRDNAKNILYLQMSL

CDR-H3 HC-F4  
 MSED TAMYYCAR DDYYYGSHFDAMDY WGQGTSVTVSS SEQ ID NO: 1

6. Secuencia de aminoácidos de VR LC, incluidas las regiones marco (F1, F2, F3 y F4) y las CDRs (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3) tal como se marca. Las regiones marco 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).

LC-F1 CDR-L1 LC-F2  
 DIVL TQSPASLAVSLGQRATISY RASKSVSTSGYSYMH WNQQKPGQPPRLLIY

CDR-L2 LC-F3 CDR-L3  
 LVS NLES EVPARFSGSGSDTFTLNIHPVEEEDAATYYC QHIRELTR

LC-F4  
 SEGGTKLEIKR SEQ ID NO: 2

10 7. Secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3:

CDR-H1: DYYMY SEQ ID NO: 3  
 CDR-H2: TINDGGTHY SEQ ID NO: 4  
 CDR-H3: DDYYYGSHFDAMDY SEQ ID NO: 5

8. Secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3:

15 CDR-L1: RASKSVSTSGYSYMH SEQ ID NO: 6  
 CDR-L2: LVS NLES SEQ ID NO: 7  
 CDR-L3: QHIRELTR SEQ ID NO: 8

Ejemplo 10: Estudios Futuros

20 Los autores de la invención estudiarán la capacidad de influir en el crecimiento y la progresión del melanoma empleando a) dos fuentes complementarias de melanoma humano (líneas celulares de melanoma humano establecidas y células de melanoma recientemente aisladas, derivadas de tumores humanos primarios y metastásicos); b) dos sistemas modelo para el estudio de estas células (rastreo subcutáneo de tumorigénesis en ratones inmunodeficientes, y tumorigénesis más relevante tal como se produce en xenoinjertos de piel humanos auténticos); y c) dos estrategias alternativas para la abrogación de células madre de melanoma

25 (quimiosensibilización a través del bloqueo funcional de ABCB5, y exterminio de células madre a través de inmunotoxina o ARNs inhibidores administrados específicamente a dianas de células madre ABCB5+).

Los autores de la invención investigarán si la reversión de la quimiorresistencia de células madre del melanoma fijada como objetivo a ABCB5 también puede inhibir el inicio/la progresión del tumor en xenoinjertos de piel de Rag2-/-ratón /ser humano quiméricos in vivo.

Las inmunotoxinas dirigidas a tumores se han construido con éxito conjugando mAbs dirigidos a antígenos específicos del sitio del tumor a agentes citotóxicos de otro modo indiscriminadamente tales como toxinas, radionucleidos y factores de crecimiento. Para los estudios propuestos, los autores de la invención se centraron inicialmente en la utilización de una molécula de este tipo, la gelonina, una toxina vegetal inactivadora de ribosomas de 29 kDa, ya que se ha demostrado que gelonina, cuando se utiliza en inmunoconjugados dirigidos a antígenos específicos para el melanoma, ejerce una citotoxicidad específica en modelos de xenoinjerto de melanoma humano A375 también empleados en esta propuesta, lo que indica que los inmunoconjugados de gelonina son excelentes candidatos para el desarrollo clínico. En otros estudios futuros, también prevén estudiar inmunoconjugados de radionucleidos que impliquen, por ejemplo, itrio, que se sabe que ejerce efectos antimelanoma. Cuando se utilizan inmunotoxinas de gelonina que fijan como objetivo ABCB5 como una estrategia para eliminar selectivamente in vivo subpoblaciones de xenoinjerto de melanoma ABCB5+, las inmunotoxinas de gelonina que fijan como objetivo ABCB5 implican el mAb 3C2-1D12 de gelonina/anti-ABCB5 o conjugados químicos de gelonina/mAb control del isotipo sintetizados y purificados tal como se describió previamente. Además, debido a las limitaciones potenciales de los inmunoconjugados de mAb intactos con respecto a la penetración en el tumor, también utilizarán proteínas de fusión sFv 3C2-1D12 anti-ABCB5/gelonina recombinantes, que se construirán por fusión del gen 3C2-1D12 sFv anti-ABCB5, generado como anteriormente, a ADN de gelonina, utilizando el método de PCR de extensión de solapamiento por corte y empalme. La inmunotoxina de fusión recombinante se expresará en *E. coli* y se purificará como se describió previamente. Las proteínas de fusión sFv/gelonina recombinantes se generarán de una manera idéntica a partir de líneas celulares de hibridoma murino productoras del mAb control del isotipo.

Los autores de la invención también desarrollarán y utilizarán la administración de ARNsi mediada por anticuerpos ABCB5, específica para células diana a oncogenes específicos como una estrategia para inhibir selectivamente poblaciones madre tumorales del melanoma ABCB5+ in vivo. Aunque la administración de ARNs interferentes pequeños (ARNsi) a las células ha sido hasta hace poco un obstáculo clave para su aplicación terapéutica in vivo, un enfoque novedoso que implica proteínas de fusión anticuerpo/protamina como vehículos de administración de ARNsi, ha demostrado recientemente una eficacia en la administración de ARNsi sistémica, específica para el tipo de células a tumores de melanoma en modelos animales experimentales in vivo, y demostró ser eficaz para inhibir el crecimiento de melanoma in vivo cuando ARNsi dirigidos a MYC, MDM2 y VEGF eran fijados como objetivo a anticuerpos a un modelo de receptor expresado en células de melanoma murino B16. Este enfoque aprovecha las propiedades de unión a ácidos nucleicos de protamina, que nuclea normalmente el ADN en el esperma, para unir ARNsi de diversas especificidades y administrarlos a las células que portan un marcador de la superficie celular específico cuando la protamina se fusiona con los fragmentos Fab del anticuerpo o sFv específicamente dirigidos a dicho marcador. Con el fin de utilizar esta estrategia para fijar como objetivo células madre de melanoma que expresan ABCB5, los autores de la invención van a construir una proteína de fusión recombinante anti-ABCB5 3C2-1D12 sFv/protamina (ABCB5 sFv-P), por fusión del gen anti-ABCB5 3C2-1D12 sFv a ADN de protamina, utilizando el método de PCR de extensión de solapamiento por corte y empalme. La proteína de fusión recombinante ABCB5 sFv-P se expresará y purificará tal como se describió previamente. ABCB5 sFv-P se utilizará inicialmente para administrar ARNsi dirigido a MYC, ya que la regulación negativa de MYC dirigida a genes inhibe el crecimiento tumoral in vivo no solo en el melanoma B16 murino, sino también en ratones portadores de xenoinjertos de melanoma humanos establecidos, lo que conduce a una apoptosis extensa de células tumorales a través de la inducción de p53 y la inhibición de las proteínas Bcl-2. Los autores de la invención ya han encontrado MYC constantemente expresado en subpoblaciones de melanoma humano ABCB5+. Además, la expresión génica de MYC humana puede inhibirse eficazmente mediante enfoques de ARNi, y los oligonucleótidos de ARNsi dirigidos a MYC validados en estos estudios están disponibles comercialmente en Dharmacon, Inc. (Chicago, IL). En los estudios propuestos, la capacidad de unión de sFv-P a ABCB5 para ARNsi de MYC, la administración de células diana de ARNsi de MYC mediada por ABCB5 y la resultante inhibición del gen MYC, y el bloqueo mediado por ABCB5 sFv-P/ARNsi de MYC de la proliferación de células tumorales primero debe examinarse in vitro en cultivos de melanoma humano G3361 y A375 exactamente tal como se describió previamente.

El protocolo de estudio in vivo para la fijación como objetivo de células madre de melanoma ABCB5+ empleará los modelos de xenoinjerto de tumor de ser humano a ratón utilizando ratones NOD-SCID así como ratones quiméricos quiméricos de la piel Rag2-/-/humanos como receptores de xenoinjertos de melanoma humano derivados de líneas celulares establecidas o recientemente aisladas de pacientes humanos, exactamente como ya se describió arriba. En una primera serie de experimentos destinados a evaluar los efectos de inmunotoxinas (mAb ABCB5/gelonina o sFv/gelonina) o de ABCB5 sFv-P/ARNsi de MYC en el inicio del tumor, las inmunotoxinas (mAb ABCB5/gelonina o sFv/gelonina o controles) se administrarán en 0,25 ml de PBS estéril a través de inyección en la vena de la cola, y ABCB5 sFv-P complejo con ARNsi de MYC o los controles se administrarán los días 0, 1 y 3 después de la implantación del tumor mediante inyección en la vena de la cola (80 µg de ARNsi en un volumen de inyección de 100 µl en una relación molar de ABCB5 sFv-P/ARNsi total de 1:6) a receptores murinos de xenoinjertos de células de melanoma humano aleatorizados el día 0 después de xenotrasplantes en los siguientes grupos de tratamiento y control (n = 10 animales replicados para cada línea celular de melanoma y para cada muestra de célula tumoral recientemente aislada de cada uno de n = 10 melanomas primarios y n = 10 metástasis de melanoma, xenoinjertadas s.c. a ratones NOD-SCID o por vía intradérmica a piel humana/Rag2-/- quimera de ratones): 1) mAb ABCB5/gelonina 500 µg/i.v. q.o.d. de ratón comenzando el día 0; 2) mAb de control de isotipo/gelonina 500 µg/i.v. q.o.d. de ratón comenzando el día 0; 3) ABCB5 sFv/gelonina 500 µg/ratón i.v. q.o.d. comenzando el día 0; 4) sFv

control/gelonina 500 µg/i.v. q.o.d. de ratón comenzando el día 0; 5) ABCB5 sFv-P/ARNsi de MYC i.v. los días 0,1 y 3; 6) ABCB5 sFv-P/ARNsi control i.v. los días 0,1 y 3; 7) ABCB5 sFv-P i.v. 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	mAb ABCB5/gelonina 500 µg/ratón i.v. q.o.d. comenzando el día 0
2	10	mAb control del isotipo/gelonina 500 µg/ratón i.v. q.o.d. comenzando el día 0
3	10	ABCB5 sFv/gelonina 500 µg/ratón i.v. q.o.d. comenzando el día 0
4	10	sFv control/gelonina 500 µg/ratón i.v. q.o.d. comenzando el día 0
5	10	ABCB5 sFv-P/ARNsi de MYC i.v. los días 0,1 y 3
6	10	ABCB5 sFv-P/ARNsi control i.v. los días 0,1 y 3
7	10	ABCB5 sFv-P i.v. los días 0,1 y 3

5 En un segundo conjunto de experimentos destinados a evaluar los efectos de inmunotoxinas (mAb ABCB5/gelonina o sFv/gelonina) o de ABCB5 sFv-P/ARNsi de MYC en la progresión del tumor de tumores establecidos, los receptores murinos de xenoinjertos de células de melanoma humano se aleatorizarán el día 7 después del xenotrasplante (cuando se establecen los tumores) en los grupos de tratamiento y control resumidos en la Tabla 7 (n = 10 animales replicados para cada una de las líneas celulares de melanoma y para cada una de las muestras de células tumorales recientemente aisladas de cada uno de n = 10 melanomas primarios y n = 10 metástasis de melanoma, xenoinjertadas s.c. a ratones NOD-SCID o intradérmicamente a piel humana/Rag2-/-quimeras de ratones):

Tabla 3

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

15 La formación/el crecimiento del tumor clínico se analizará diariamente como un curso temporal mediante la determinación del volumen del tumor (TV) de acuerdo con la fórmula establecida  $[TV (mm^3) = \pi / 6 \times 0,5 \times longitud \times (anchura)^2]$  durante la duración de la experimento (45 días). Las diferencias estadísticamente significativas en la formación de tumores en función del régimen de tratamiento aplicado se evaluarán utilizando el test exacto de Fisher. Las diferencias en los volúmenes de los tumores entre los grupos experimentales se determinarán utilizando ANOVA no paramétrico. Los valores de P de dos colas < 0,05 se considerarán estadísticamente significativos. El análisis inmunofluorescente e inmunohistoquímico de cada uno de los xenoinjertos tumorales trasplantados, diseccionados de animales de todos los grupos de tratamiento sacrificados inicialmente el día 45 del experimento (se realizarán sacrificios secuenciales [p. ej. los días 10, 20, 30 y 45] en base a los hallazgos del día 45 y, además, del examen de los tumores primarios, los animales sacrificados serán sometidos a una necropsia, todas las metástasis serán evaluadas y todos los tejidos serán evaluados patológicamente para la evidencia de toxicidad mediada por el régimen de tratamiento aplicado). La expresión de ABCB5 y la co-expresión de ABCB5 con CD133 se ensayarán mediante doble tinción inmunoenzimática secuencial de HRP/AP de secciones de xenoinjerto de melanoma congelado tal como se describió previamente. Las secciones de tumores se analizarán mediante microscopía de campo brillante, y los porcentajes medios de tinciones positivas para cada marcador serán semicuantitativamente (sin positividad: -; <10% de positividad: +; 10-50% de positividad: ++; > 50% de positividad: ++++) clasificados según el recuento de células en tres campos de microscopía (aumento de 400x) para cada condición de tinción como se describió previamente. Utilizando microscopía fluorescente y filtros separados para cada uno de los fluorocromos, se contarán las células RFP-positivas (origen ABCB5+) y GFP-positivas (origen ABCB5-) (100 células/muestra) y se calcularán las relaciones de células RFP/GFP dentro de cada uno de los tumores. Las relaciones medias derivadas de animales replicados sometidos a cada uno de los regímenes de

tratamiento se compararán estadísticamente utilizando ANOVA no paramétrico. Para evaluar la eficacia de las estrategias de fijación de objetivo de ABCB5+, las células de melanoma apoptótico que crecen en subcutis murina, xenoinjertos de piel humana y en sitios de metástasis se identificarán de acuerdo con los criterios establecidos utilizados para microscopía óptica y se confirmarán mediante el ensayo TUNEL. También, los autores de la invención analizarán inmunohistoquímicamente la expresión de proteínas relevantes para las vías apoptóticas, incluidas Bax, Bcl-2 y Bcl-XL. Finalmente, estos resultados se correlacionarán con un rastreo de marcadores relacionados con la proliferación celular (MIB-1, PCNA y ciclina D1/D3). Las células positivas se enumerarán manualmente en perfiles en sección transversal y mediante el uso de programas de formación de imágenes asistidas por ordenador disponibles en el laboratorio del co-IP (GFM) que deberían mejorar significativamente la eficiencia de la cuantificación.

Listado de secuencias

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.

<120> FIJACIÓN COMO OBJETIVO DE ABCB5 PARA LA TERAPIA DEL CÁNCER

<130> WOLBT/P44049EPdiv1

15 <140>EP 13163810.8  
< 141> 15-04-2013

<150>US 60/923128  
< 151> 12-04-2007

20 <150>US 61/007059  
< 151> 11-12-2007

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

25 < 211> 123  
< 212> PRT  
< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> Péptido sintético

<400> 1

ES 2 687 270 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Asn Asp Gly Gly Thr His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Met Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ser His Phe Asp Ala Met Asp Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 2  
 < 211> 111  
 < 212> PRT  
 < 213> secuencia artificial

<220>  
 < 223> Péptido sintético

<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Glu Val Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asp Thr Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg  
 85 90 95  
 Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 3

ES 2 687 270 T3

< 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> secuencia artificial

5 <220>  
 < 223> Péptido sintético

<400> 3

Asp Tyr Tyr Met Tyr  
 1 5

10 <210> 4  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> secuencia artificial

<220>  
 < 223> Péptido sintético

<400> 4

15 Thr Ile Asn Asp Gly Gly Thr His Thr Tyr  
 1 5 10

20 <210> 5  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> secuencia artificial

<220>  
 < 223> Péptido sintético

<400> 5

25 Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ser His Phe Asp Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

30 <210> 6  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> secuencia artificial

<220>  
 < 223> Péptido sintético

<400> 6

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His  
 1 5 10 15

35 <210> 7  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> secuencia artificial

40 <220>  
 < 223> Péptido sintético

ES 2 687 270 T3

<400> 7

Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser  
1 5

<210> 8  
< 211> 8  
5 < 212> PRT  
< 213> secuencia artificial

<220>  
< 223> Péptido sintético

<400> 8

10 Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg  
1 5

<210> 9  
< 211> 369  
< 212> ADN  
< 213> secuencia artificial

15 <220>  
< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 9

```

gaagtgcaac tggaggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaagctc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactattaca tgtattgggt tcgtcagact 120
ccgaaaaga ggctggagtg ggtcgccacc attaatgatg gcggtactca cacctactat 180
ccagacagtc tgaaggggagc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa catcctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgat gtctgaggac acagccatgt attattgtgc aagagatgat 300
tattactacg gtagtcactt cgatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360
gtctcctca 369
    
```

20 <210> 10  
< 211> 333  
< 212> ADN  
< 213> secuencia artificial

<220>  
< 223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 10

```

gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggaac 120
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180
gaggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattagggg gcttacacgt 300
tcggaggggg gcaccaagct ggaaatcaaa cgg 333
    
```

ES 2 687 270 T3

<210> 11  
 < 211> 15  
 < 212> ADN  
 < 213> secuencia artificial

5 <220>  
 < 223> Oligonucleótido sintético

<400> 11

gactattaca tgtat 15

10 <210> 12  
 < 211> 30  
 < 212> ADN  
 < 213> secuencia artificial

<220>  
 < 223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 12

accattaatg atggcgggtac tcacacctac 30

20 <210> 13  
 < 211> 42  
 < 212> PRT  
 < 213> secuencia artificial

<220>  
 < 223> Péptido sintético

<400> 13

Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Gly  
 1 5 10 15

Gly Thr Ala Gly Thr Cys Ala Cys Thr Thr Cys Gly Ala Thr Gly Cys  
 20 25 30

Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys  
 35 40

25 <210> 14  
 < 211> 45  
 < 212> ADN  
 < 213> secuencia artificial

30 <220>  
 < 223> Oligonucleótido sintético

<400> 14

agggccagca aaagtgtcag tacatctggc tatagttata tgcac 45

35 <210> 15  
 < 211> 21  
 < 212> ADN  
 < 213> secuencia artificial



# ES 2 687 270 T3

<220>  
< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 15

ttgtatcca acctagaatc t 21

5 <210> 16  
< 211> 24  
< 212> ADN  
< 213> secuencia artificial

10 <220>  
< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 16

agcacatta gggagcttac acgt 24

15 <210> 17  
< 211> 1419  
< 212> ADN  
< 213> secuencia artificial

<220>  
< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 17

ES 2 687 270 T3

atggactttg ggctgagcct ggttttcctt gtccttgttt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60  
 gtgcaactgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gagggccct gaagctctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtgac tattacatgt attgggttcg tcagactccg 180  
 gaaaagaggc tggagtgggt cgccaccatt aatgatggcg gtactcacac ctactatcca 240  
 gacagtctga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacat cctgtacctg 300  
 caaatgagca gtctgatgtc tgaggacaca gccatgtatt attgtgcaag agatgattat 360  
 tactacggta gtcacttcga tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 420  
 tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 480  
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540  
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca ccttcccggc tgcctacag 600  
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag ctggggcacc 660  
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720  
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 780  
 gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 840  
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900  
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagcccg gaggagcag 960  
 tacaacagca cgtaccgggt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtgaat 1020  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1080  
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1140  
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggett ctatcccagc 1200  
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct 1260  
 cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320  
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380  
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctcog ggtaaatga 1419

<210> 18  
 < 211> 714  
 < 212> ADN  
 < 213> secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Oligonucleótido sintético

<400> 18

ES 2 687 270 T3

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60  
gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 120  
atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gactggaac 180  
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 240  
gaggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 300  
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattagga gcttacacgt 360  
tcggaggggg gcaccaagct ggaaatcaaa cggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac 420  
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat 480  
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tgggaaggtg ataacgccct ccaatcgggt 540  
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 600  
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 660  
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 714

<210> 19  
< 211> 1362  
< 212> ADN  
5 < 213> secuencia artificial

<220>  
< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 19

gaagtgcaac tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaagctc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactattaca tgtattgggt tcgtcagact 120  
ccgaaaaga ggctggagtg ggtcgccacc attaatgatg gcggtactca cacctactat 180  
ccagacagtc tgaaggggagc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa catcctgtac 240  
ctgcaaatga gcagtctgat gtctgaggac acagccatgt attattgtgc aagagatgat 300  
tattactacg gtagtcactt cgatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360  
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420  
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggt 480  
acgggtgctg ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540  
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgacc tgccctccag cagcttgggc 600  
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660  
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc 720  
ctggggggac cgtcagctt cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc 780  
cggaccctg aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840

10

ES 2 687 270 T3

ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgccca agacaaagcc gcgggaggag 900  
 cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960  
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020  
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagc tgtacaccct gccccatcc 1080  
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1140  
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc 1200  
 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260  
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320  
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1362

<210> 20  
 < 211> 654  
 < 212> ADN  
 < 213> secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Oligonucleótido sintético

<400> 20

gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gactggaac 120  
 caacagaaac caggacagcc acccagactc tcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180  
 gaggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattagga gcttacacgt 300  
 tcggaggggg gcaccaagct ggaaatcaaa cggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360  
 ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat 420  
 aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480  
 aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540  
 accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtacc 600  
 catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 654

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une selectivamente a ABCB5, que comprende un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una CDR1-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos DYYMY, una CDR2-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos TINDGGTHTY y una CDR3-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos DDYYYGSHFDAMDY, y un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que tiene una CDR1-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos RASKSVSTSGYMH, una CDR2-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos LVSNLES y una CDR3-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos QHIRELTR.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal aislado que se une selectivamente a ABCB5 de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal aislado se une a ABCB5 humano.
3. El anticuerpo monoclonal aislado que se une selectivamente a ABCB5 de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal aislado completamente humano.
4. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une selectivamente a ABCB5 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en el tratamiento del cáncer.
- 15 5. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une selectivamente a ABCB5, para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 4, en donde el tratamiento comprende administrar un agente terapéutico a un compartimento intracelular de una célula cancerosa que expresa ABCB5, en donde el uso comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo monoclonal aislado que se une selectivamente a ABCB5 conjugado al agente terapéutico.
- 20 6. El anticuerpo monoclonal aislado para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 5, en donde el agente terapéutico es una toxina, un ARNsi, un agente quimioterapéutico o un anticuerpo terapéutico.
7. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento del cáncer, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es una composición formulada para administración sistémica a un sujeto.
8. El anticuerpo monoclonal aislado para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 4, en donde el cáncer incluye células madre cancerosas que expresan ABCB5.

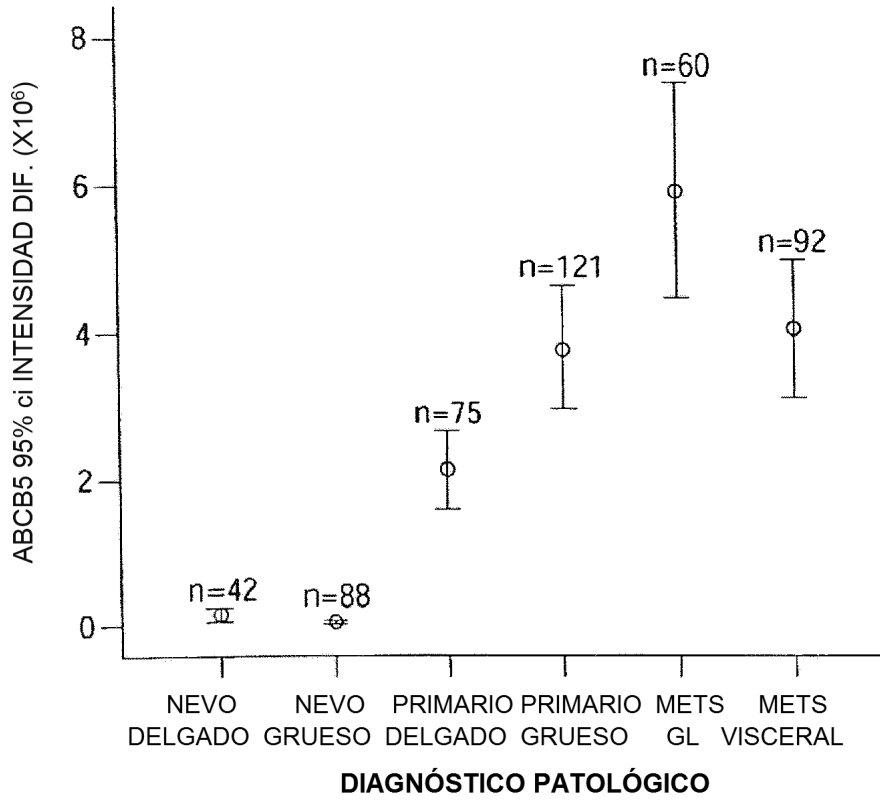


Fig. 1A

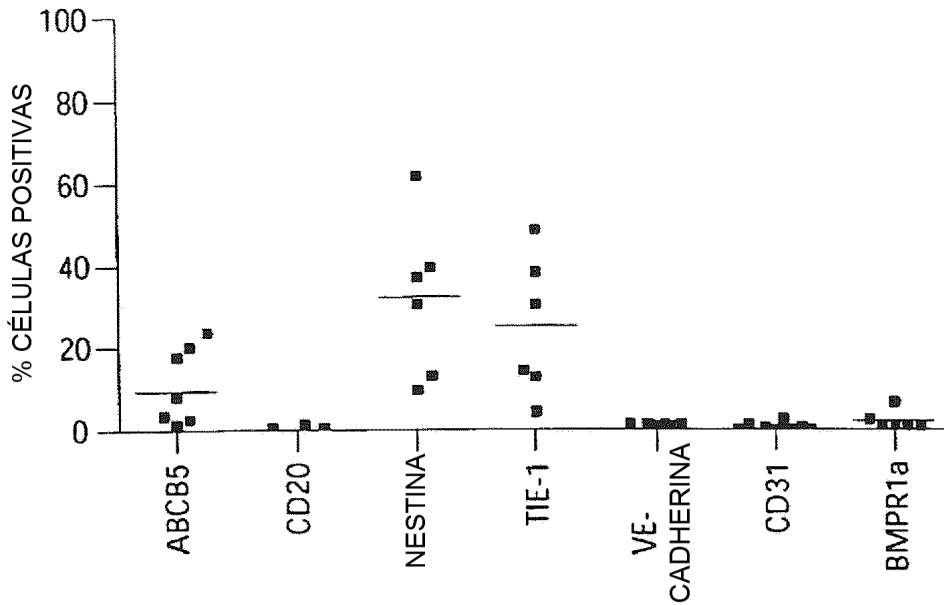


Fig. 1B

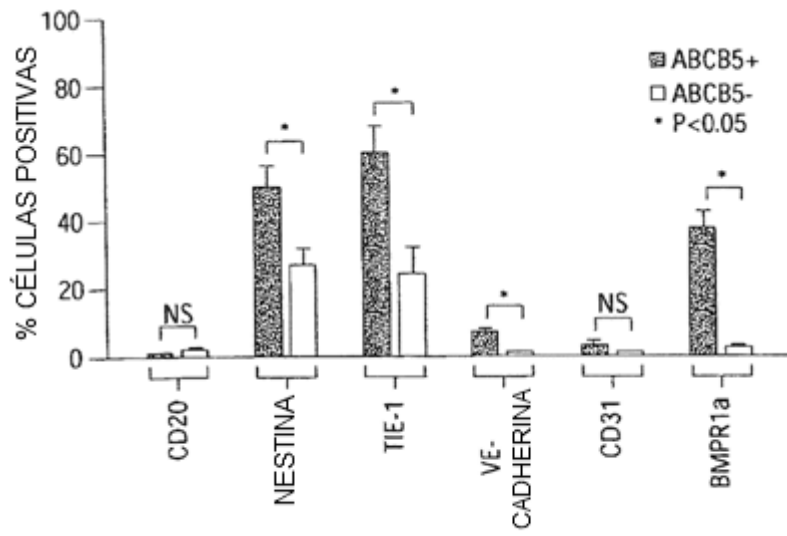


Fig. 1C

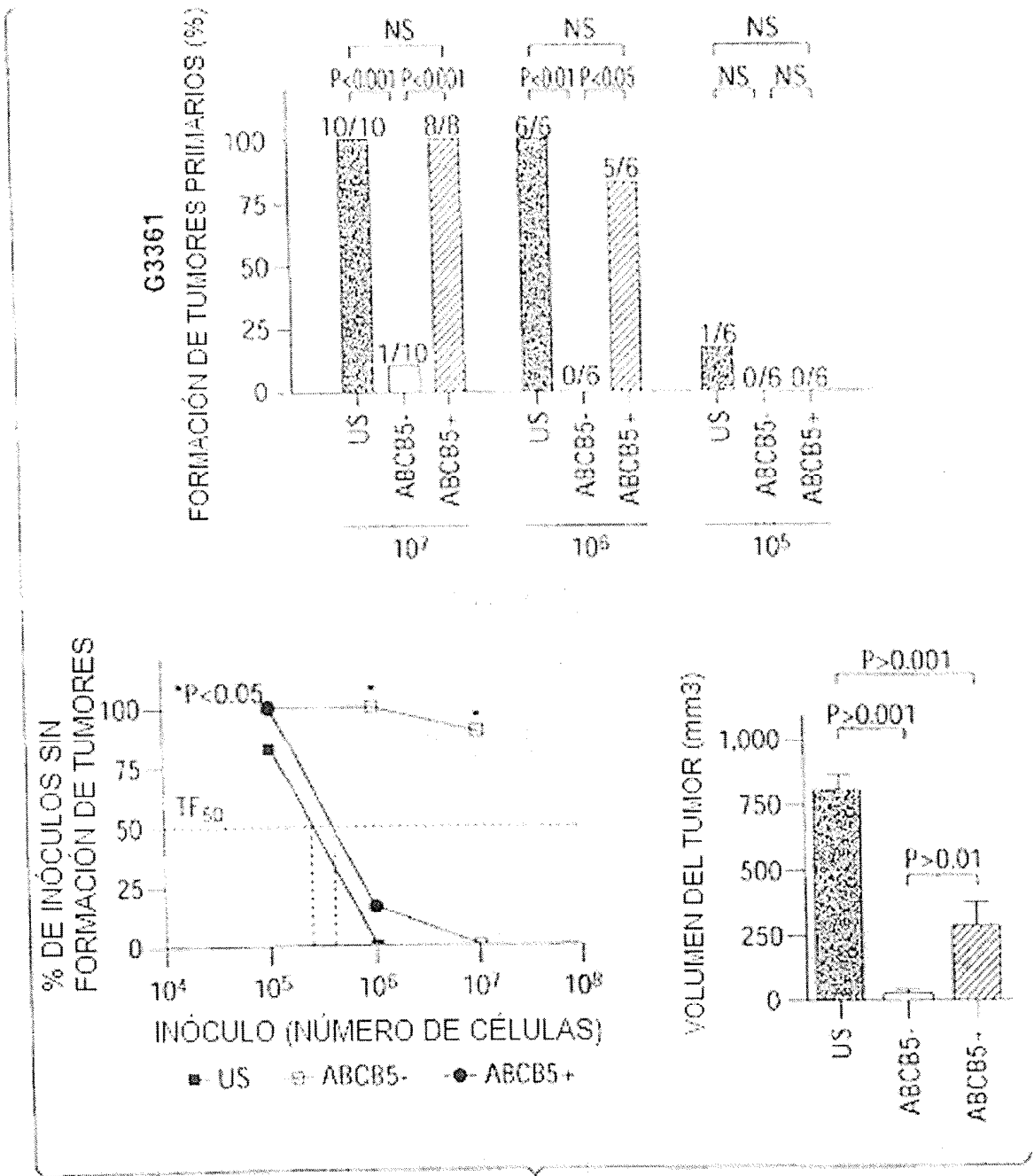


Fig. 2A



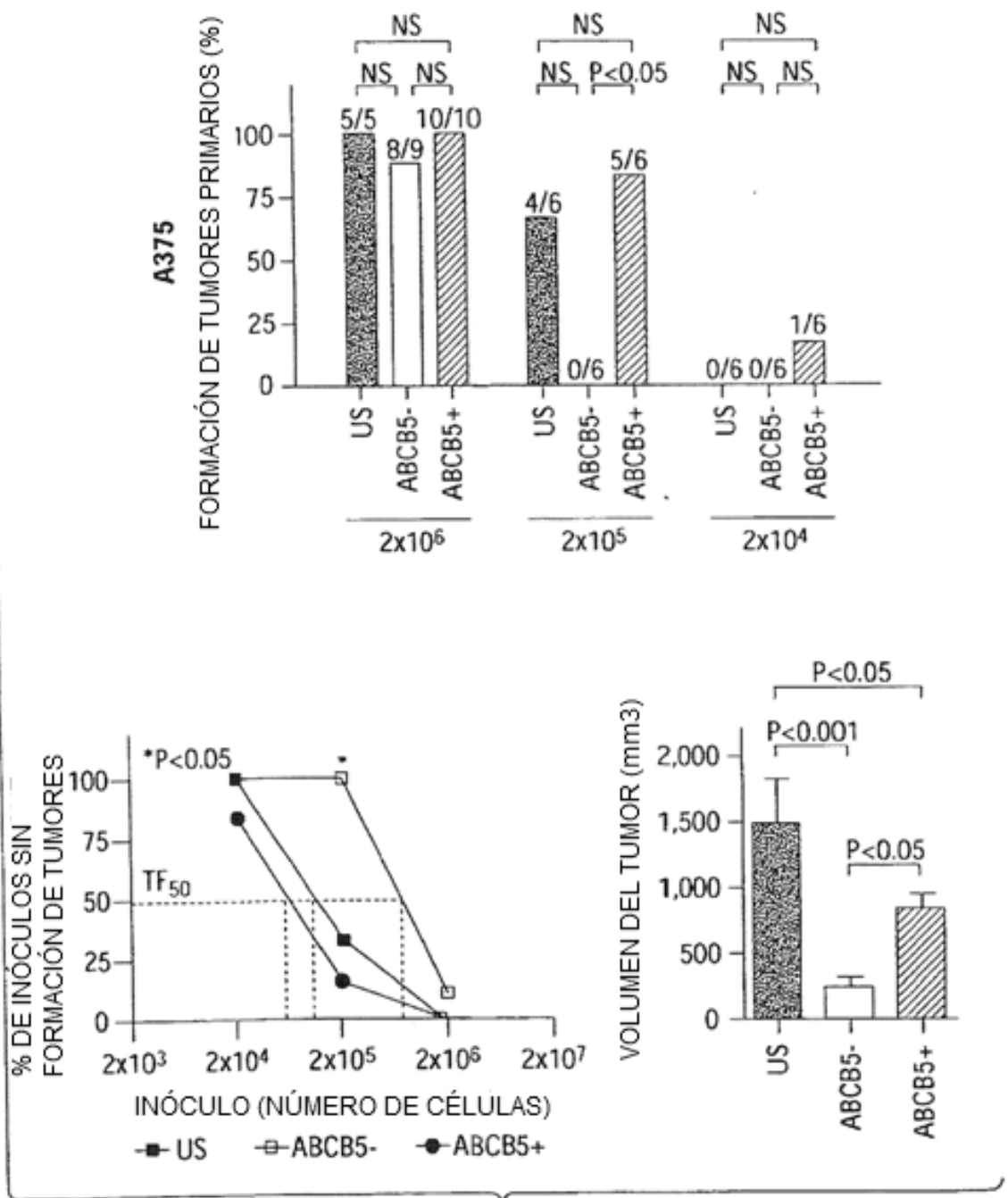


Fig. 2B

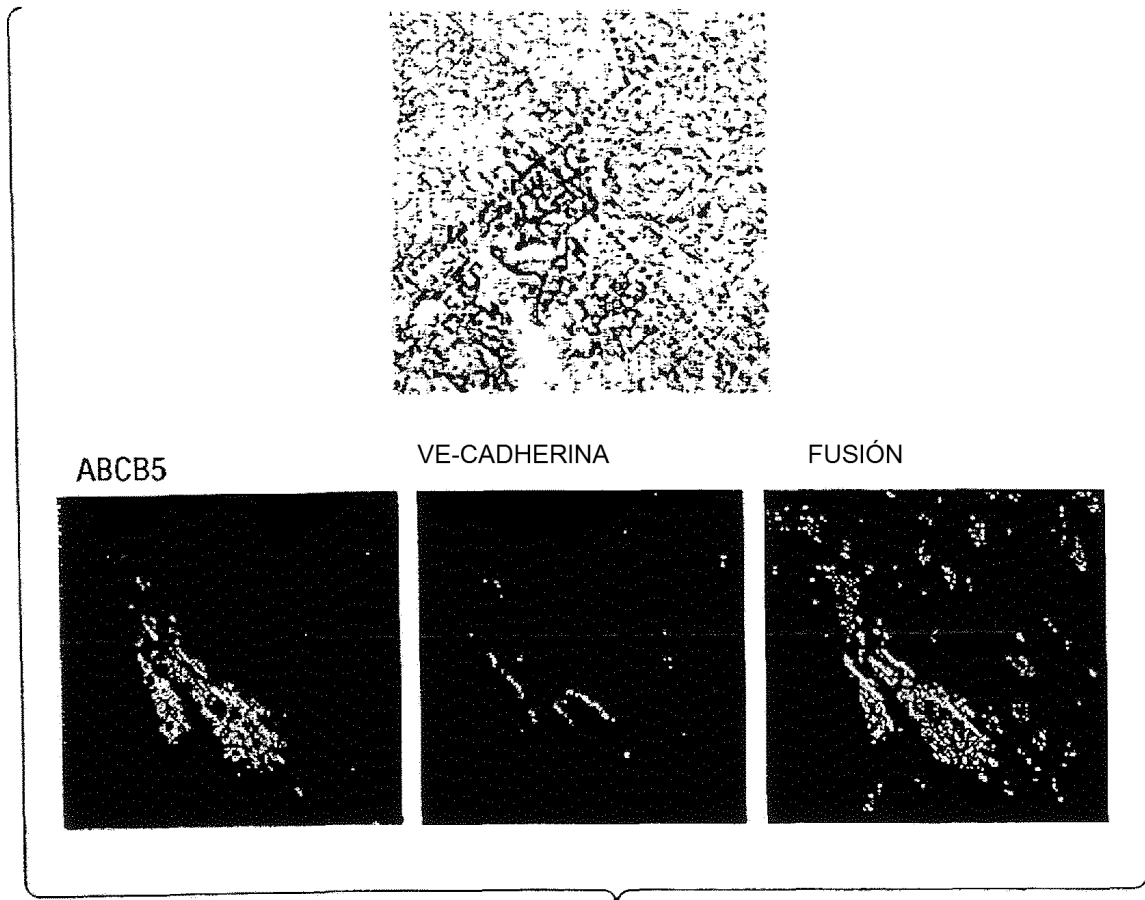


Fig. 2C

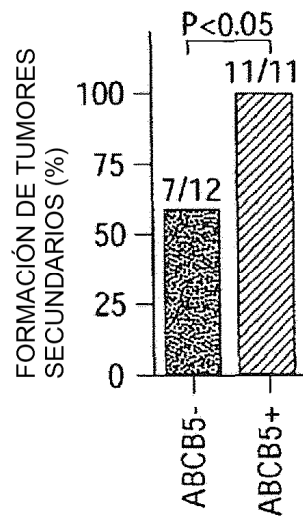


Fig. 2D

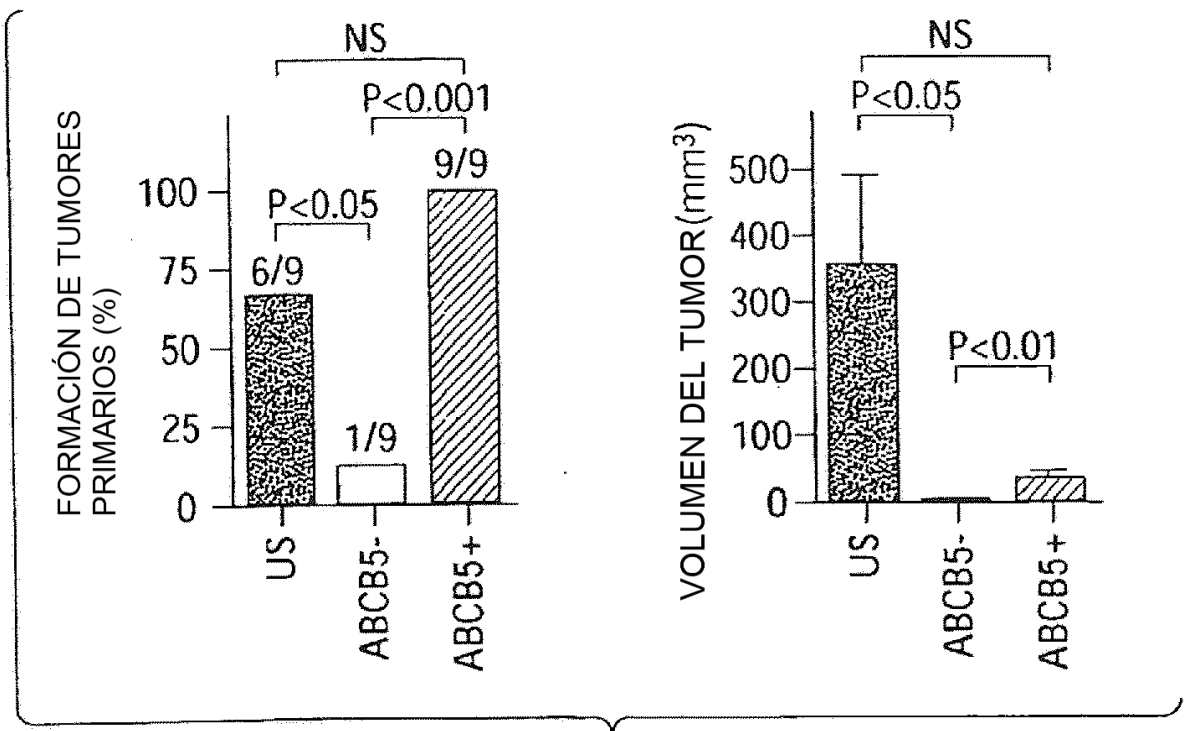


Fig. 2E

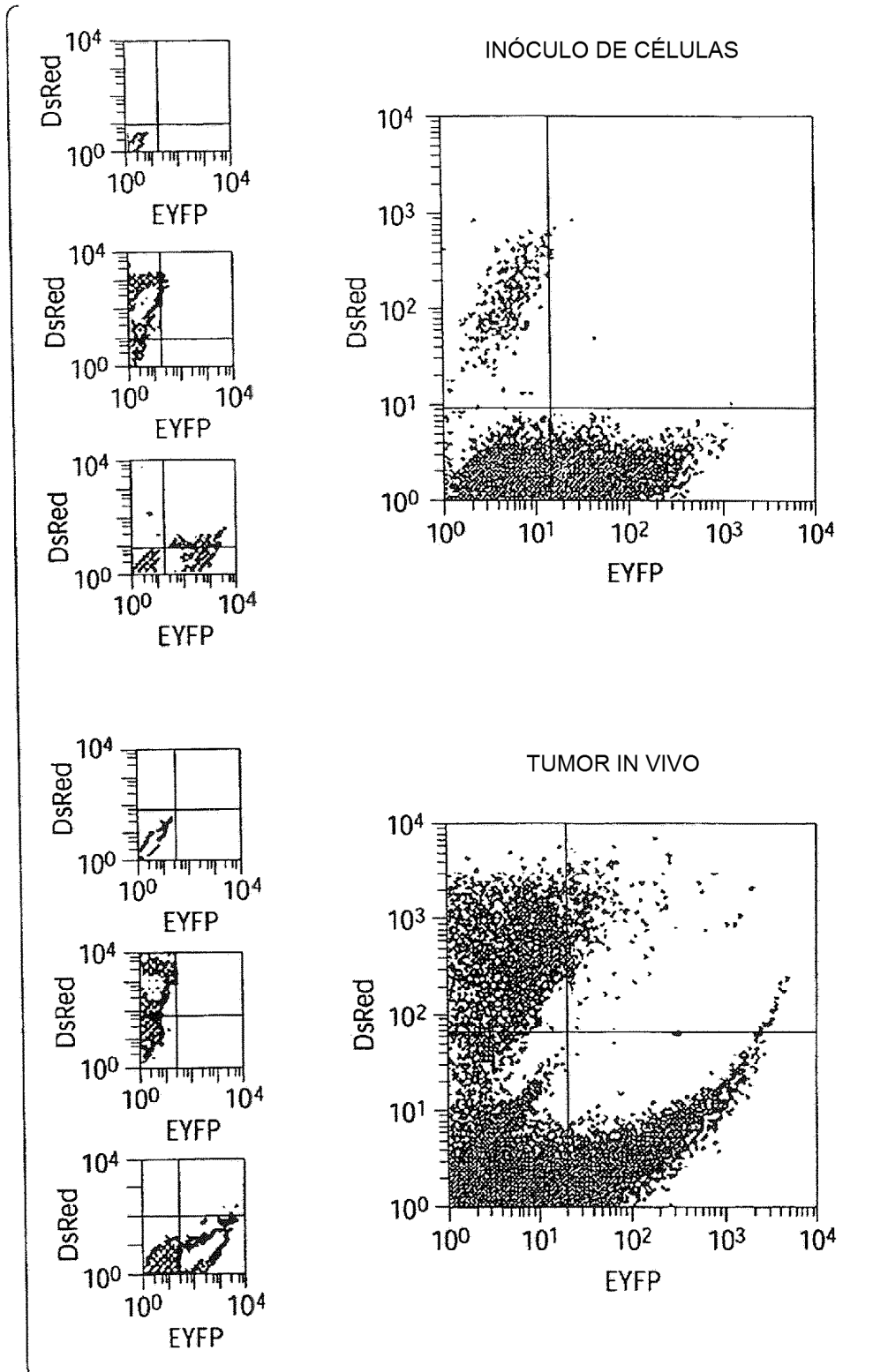


Fig. 3A

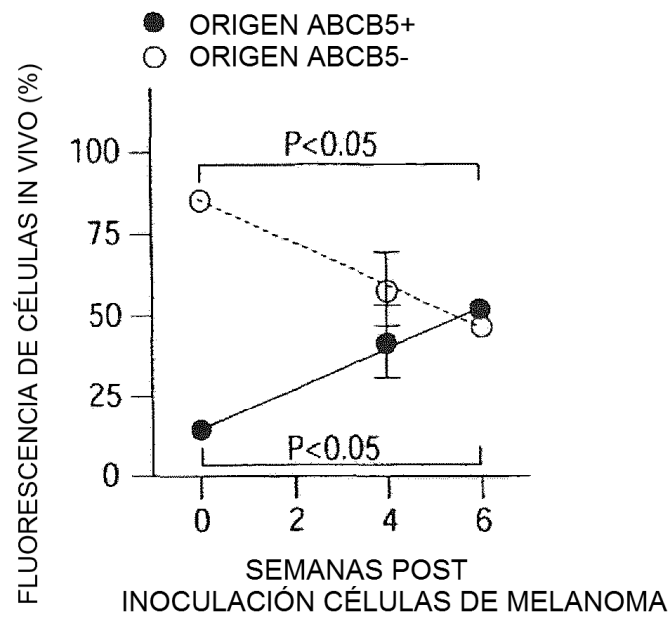


Fig. 3B

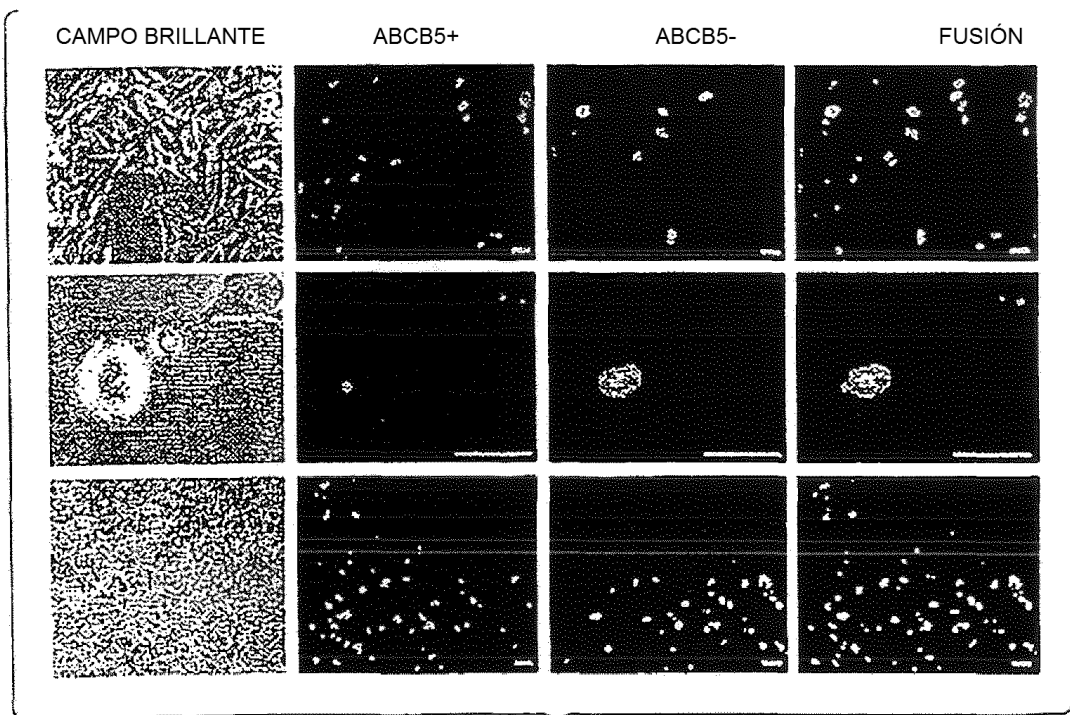


Fig. 3C

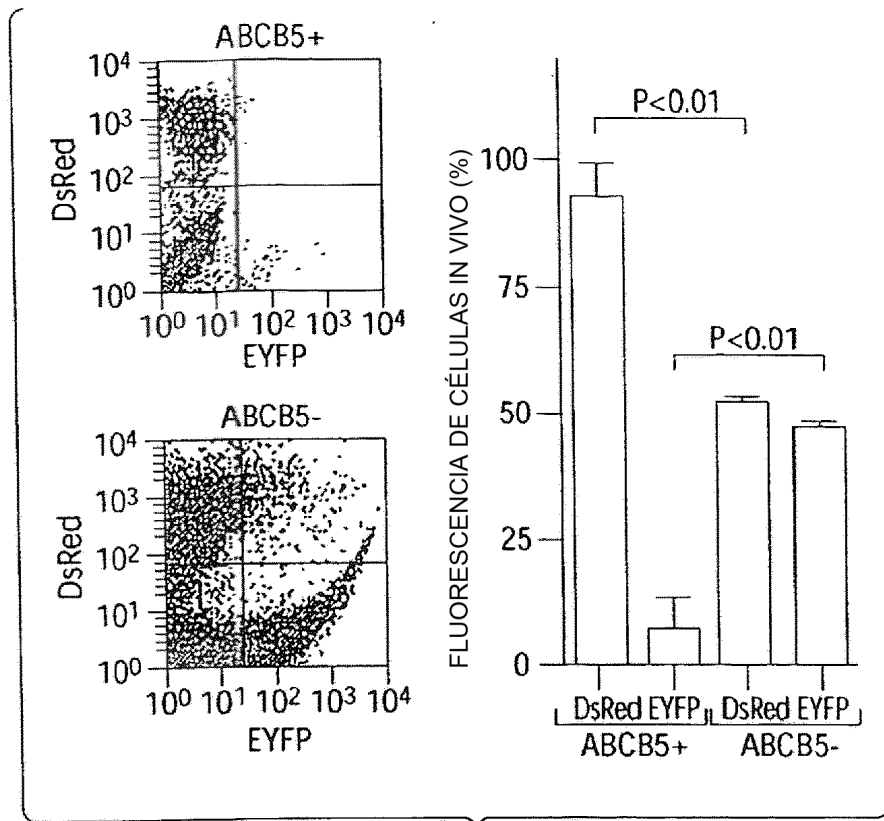


Fig. 3D

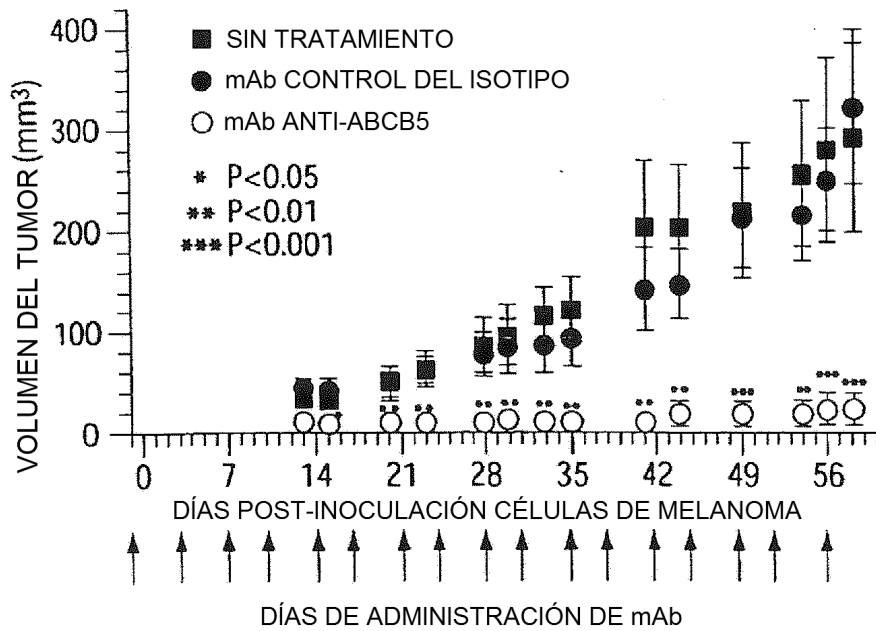


Fig. 4A

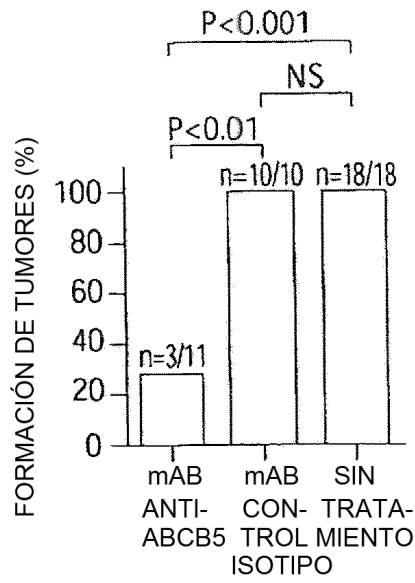


Fig. 4B

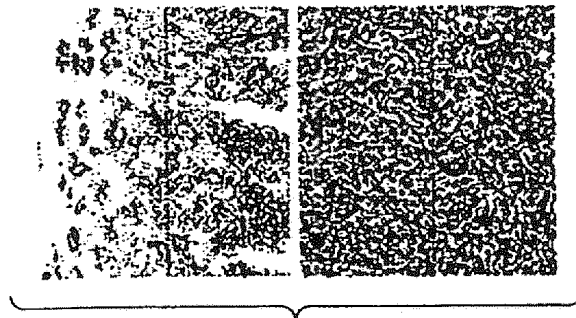


Fig. 4C

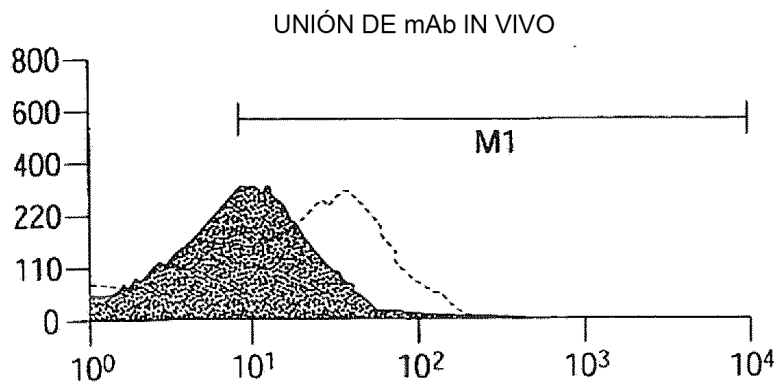


Fig. 4D

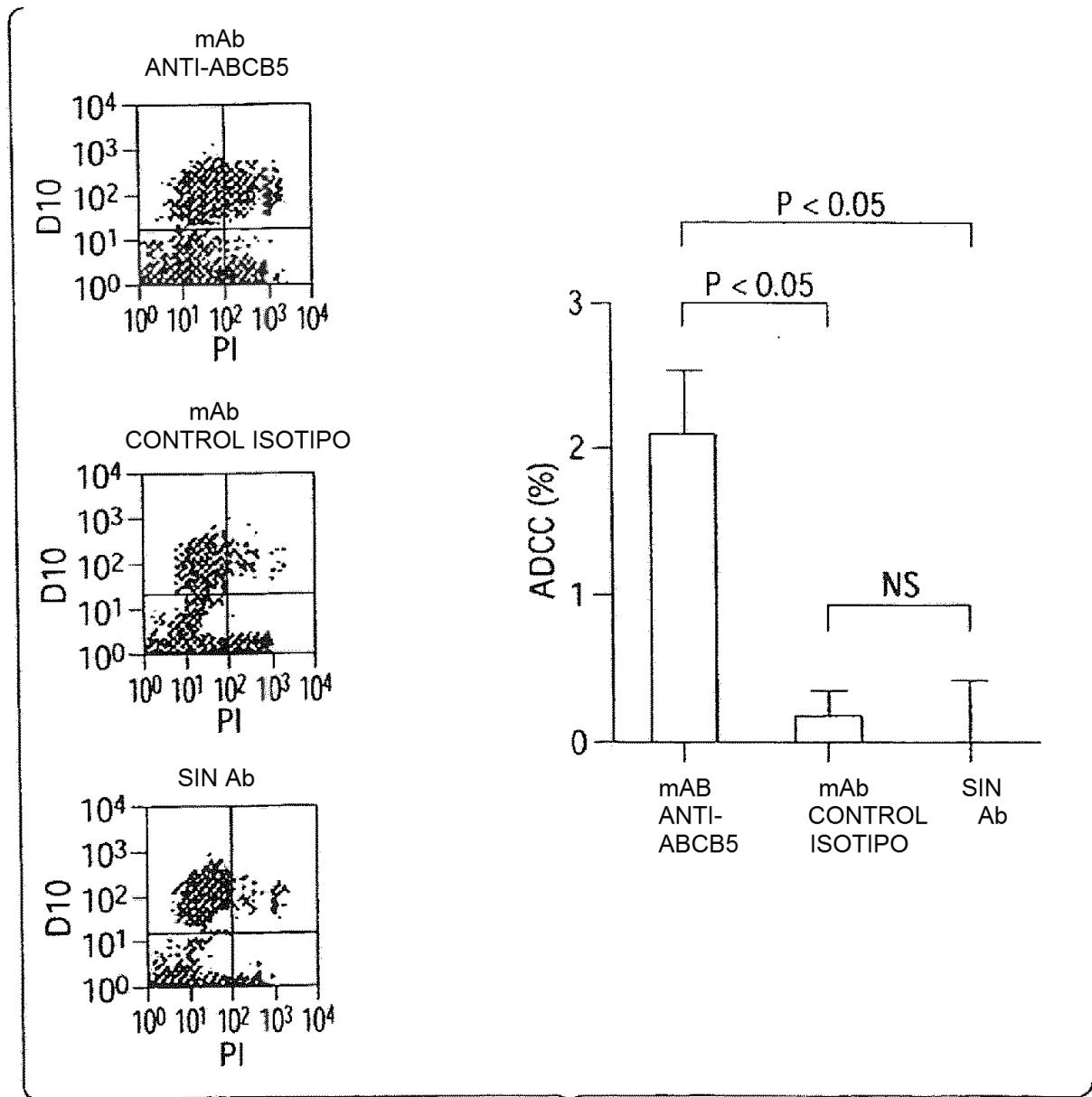


Fig. 4E



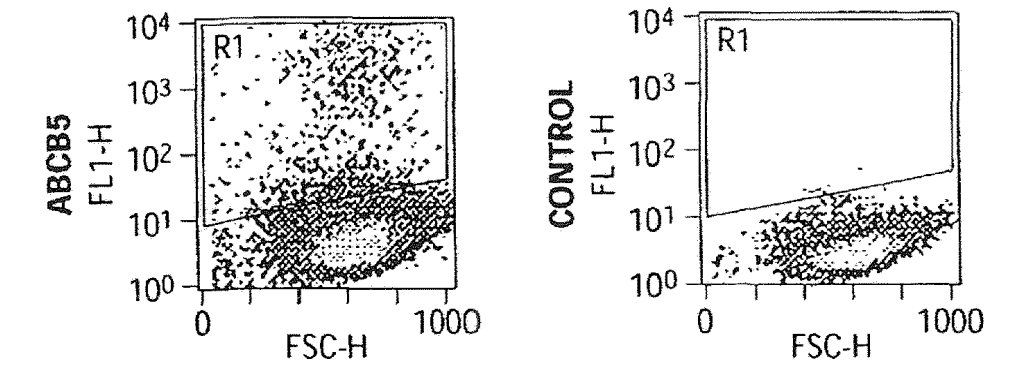


Fig. 5A

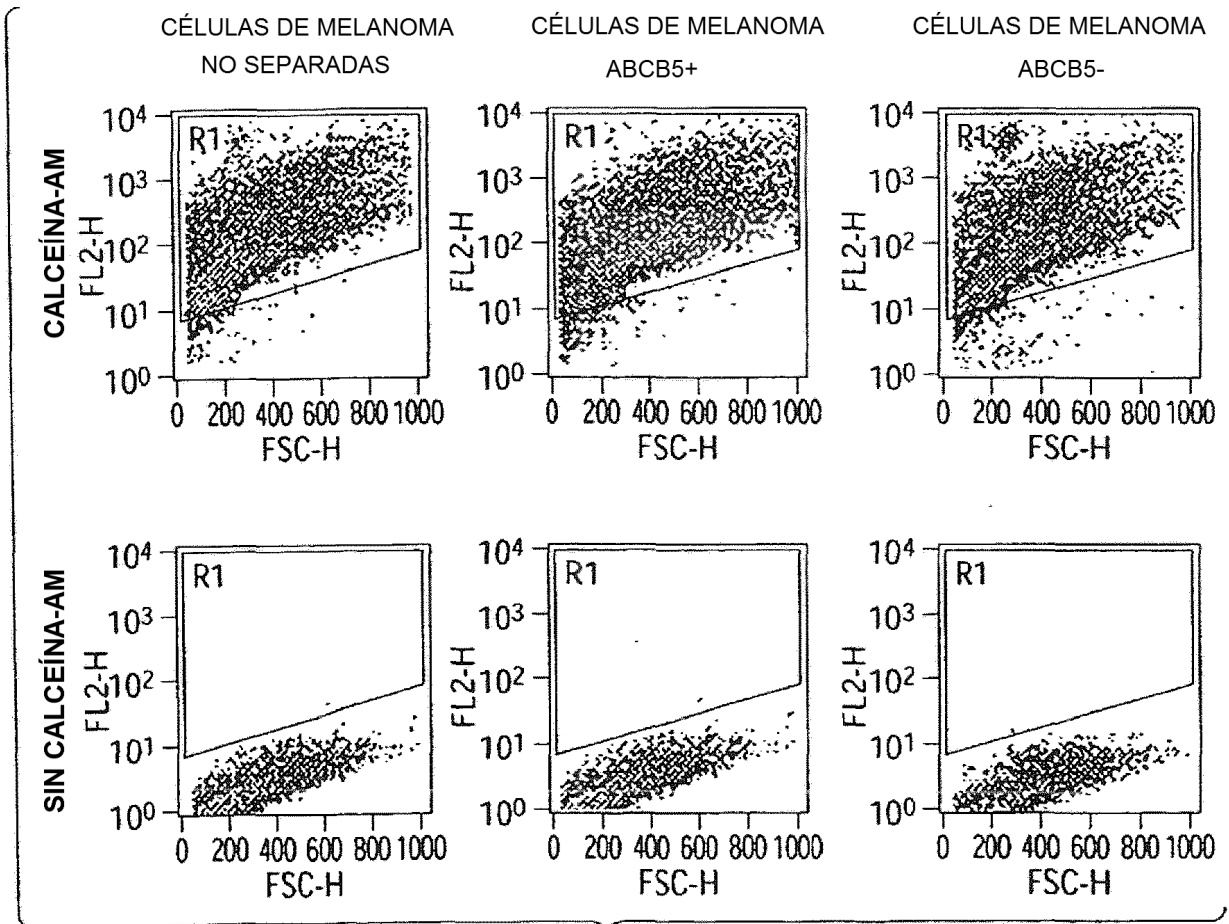


Fig. 5B

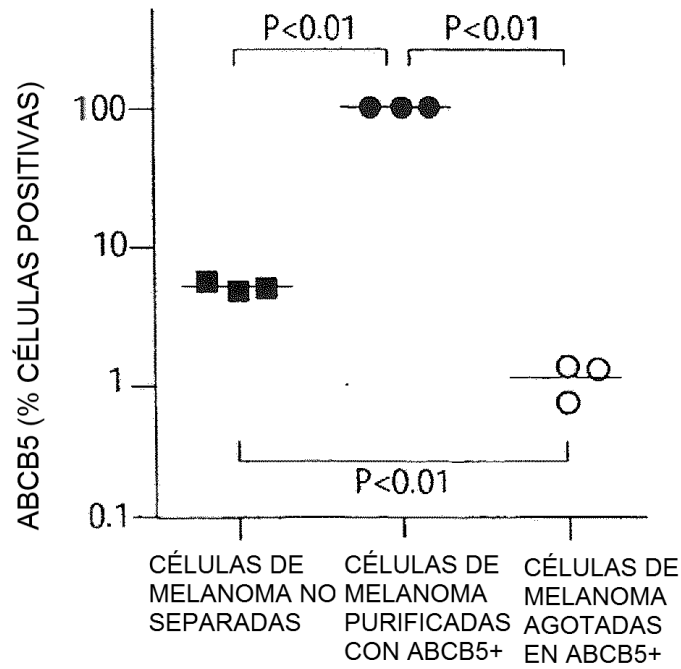


Fig. 5C

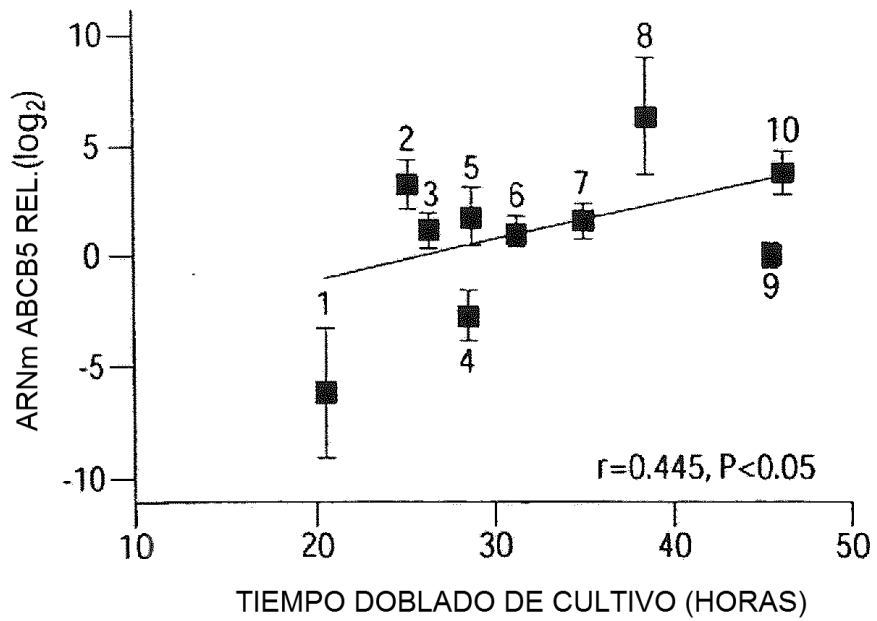


Fig. 6

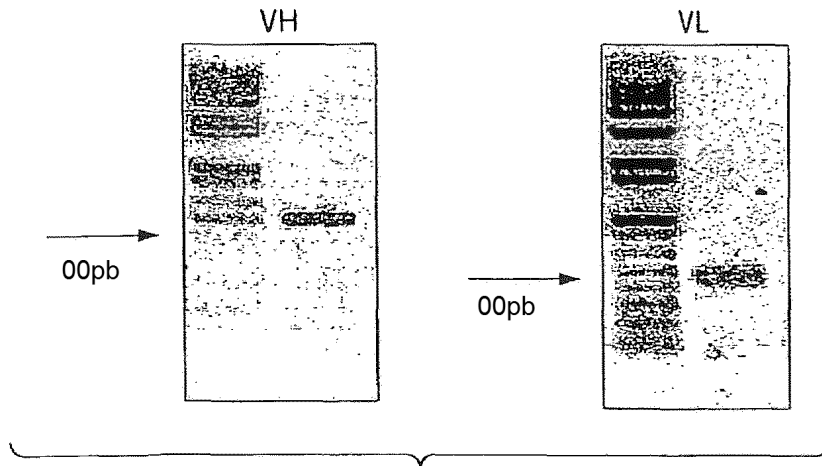


Fig. 7

```

HC-F1                                CDR-H1
EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS  DYMY

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

                CDR-H3                HC-F4
MS EDTAMY YCAR  DDYYYGSHFDAMDY  WGQGTSVTVSS

SE INDICAN LAS CUATRO REGIONES DE MARCO F1, F2, F3 Y F4, ASÍ
COMO LAS TRES REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD
CDR-H1, CDR-H2 Y CDR-H3.
    
```

Fig. 8

```

GAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTG
AAGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAC1TTTCAGTGACTATTACATGTATTGGGTTCCG
TCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCCACCATTAA2TGATGGCGGTA3CTCACA
CCTACTATCCAGACAGTCTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
ATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGATGTCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGC
AAGAGATGATTATTACTACGGTAGTCACTTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
CCTCAGTCACCGTCTCCTCA
    
```

LAS SECUENCIAS DE CDR ESTÁN SUBRAYADAS

Fig. 9

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

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

Fig. 10

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGG  
GCCACCATCTCATACAGGGCCAGCAAAAGTGTTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCA  
CTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACC  
TAGAATCTGAGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTC  
AACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGA  
GCTTACACGTTCGGAGGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

LAS SECUENCIAS DE CDR ESTÁN SUBRAYADAS.

Fig. 11

ATGGACTTTGGGCTGAGCTTGGTTTTTCCTTGCCCTGTTTTAAAAGGTGTCCAG  
TGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCCTGAA  
GCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACITTCAGTGACTATTACATGTATTGGGTTTCGT  
AGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCCACCATTAATGATGGCGGTACTCACACC  
TACTATCCAGACAGTCTGAAGGGGGGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAT  
CCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGATGTCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGCAA  
GAGATGATTATTACTACGGTAGTCACTTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC  
TCAGTACCCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC  
CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCC  
CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTC  
CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTC  
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA  
AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGC  
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAAGGA  
CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG  
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG  
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCGT  
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC  
TCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG  
GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG  
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC  
CGGAGAACAATAACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC  
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC  
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
GTAAATGA

Fig. 12

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC  
ACTGGTGACATTTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG  
GGCCACCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAGTGTACAGTACATCTGGCTATAGTTATATGC  
ACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAAC  
CTAGAATCTGAGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCT  
CAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGG  
AGCTTACACGTTCCGGAGGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT  
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACG  
CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC  
TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAAGTCTA  
CGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG  
GAGAGTGTGA

Fig. 13