

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 111**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2009** **E 16177814 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3130923**

54 Título: **Métodos terapéuticos relacionados con células madre cancerosas**

30 Prioridad:

14.11.2008 US 114490 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2020

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(50.0%)

75 Francis Street

Boston, MA 02115 , US y

CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(50.0%)

72 Inventor/es:

FRANK, MARKUS H. y

FRANK, NATASHA Y.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 796 111 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

Métodos terapéuticos relacionados con células madre cancerosas

5 **Campo de la divulgación**

La presente divulgación se refiere en parte a métodos para tratar individuos que tienen cáncer. Los métodos implican la modulación, p. ej., inducción o inhibición, de la actividad de genes que están desregulados en células madre cancerosas. En algunos aspectos, los genes de la superficie celular que están regulados positivamente en las células madre cancerosas son diana de aislamiento selectivo, detección o destrucción de células madre cancerosas en melanoma. Otros aspectos de la invención se refieren a reactivos, matrices, composiciones y equipos que son útiles para diagnosticar y tratar el cáncer.

15 **Antecedentes**

Las células madre cancerosas (CSC) autorrenovadoras inician tumores e impulsan la progresión maligna al generar y respaldar la replicación de descendencia distinta de células madre más diferenciada. (M. Al-Hajj, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 100 (7), 3983 (2003); D. Bonnet y J. E. Dick, Nat Med 3 (7), 730 (1997); C. A. O'Brien, *et al.*, Nature 445 (7123), 106 (2007); L. Ricci-Vitiani, *et al.*, Nature 445 (7123), 111 (2007); S. K. Singh, *et al.*, Nature 432 (7015), 396 (2004); T. Schatton y M. H. Frank, Pigment cell & melanoma research 21 (1), 39 (2008)). Los mecanismos por los que las CSC provocan la formación y el crecimiento de tumores y la posible función de la plasticidad de diferenciación específica de CSC en la tumorigenicidad son actualmente desconocidos. Recientemente los inventores han identificado una subpoblación de CSC basada en la expresión del mediador de quimiorresistencia ABCB5 (casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP), miembro 5) (N.Y. Frank, *et al.*, Cancer Res 65 (10), 4320 (2005); Y. Huang, *et al.*, Cancer Res 64 (12), 4294 (2004)) dentro del melanoma maligno humano (T. Schatton, *et al.*, Nature 451 (7176), 345 (2008)), un cáncer muy agresivo y resistente a fármacos. (T. Schatton y M. H. Frank, Pigment cell & melanoma research 21 (1), 39 (2008); L. Chin, L. A. Garraway y D. E. Fisher, Genes Dev 20 (16), 2149 (2006).) Las células iniciadoras de melanoma maligno (MMIC) ABCB5⁺ se correlacionan con la progresión de la enfermedad clínica y pueden ser dianas específicas para anular el crecimiento tumoral. (T. Schatton, *et al.*, Nature 451 (7176), 345 (2008)). De acuerdo con estos hallazgos, el gen de ABCB5 también se expresa preferentemente por poblaciones minoritarias de melanoma autorrenovadoras *in vitro* (G.I. Keshet, *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 368 (4), 930 (2008)) y por líneas celulares de melanoma de origen tumoral metastásico en lugar de primario, de fase de crecimiento radial (J.F. Sousa y E.M. Espreafico, BMC cancer 8, 19 (2008)). El documento WO 2006/121168 A1 se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente con PD-1 con alta afinidad. El documento EP 1537878 A1 se refiere a composiciones para el tratamiento del cáncer o infección mediante inmunopotenciación provocada por inhibición de la señal inmunosupresora inducida por PD-1, PD-L1 o PD-L2 y terapias que usan esas composiciones. El documento WO 2004/056875 A1 se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que pueden actuar como agonistas y/o antagonistas de PD-1, modulando de este modo las respuestas inmunitarias en general y, en particular, las mediadas por TcR y CD28. El documento WO 2008/127656 A1 se refiere a métodos para tratar a un sujeto mediante la manipulación de ABCB5 en una célula, así como productos relacionados, en particular, los métodos incluyen métodos para tratar el cáncer usando moléculas de unión a ABCB5 tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer.

50 La presente divulgación se refiere en parte al descubrimiento de que varios genes (denominados en el presente documento genes asociados a CSC) están desregulados en células madre cancerosas. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a matrices de diagnóstico y métodos para detectar el cáncer en un individuo basándose en la expresión de genes asociados a CSC. En otros aspectos, la divulgación se refiere a métodos útiles para tratar individuos que tienen melanoma basados en la modulación de la expresión y/o actividad de genes asociados a CSC. También se describen composiciones y equipos que son útiles para los métodos anteriores.

La divulgación, en algunos aspectos, proporciona métodos para diagnosticar el cáncer en un individuo. En algunos aspectos, los métodos implican determinar un nivel de expresión de un gen asociado a células madre cancerosas (CSC) en la tabla 5 en una muestra de prueba del individuo y comparar el nivel de expresión del gen asociado a CSC con un valor de referencia, en donde los resultados de la comparación son diagnósticos de cáncer. En algunas opciones, el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon o cáncer renal. En algunas opciones, la muestra de prueba es una biopsia tisular. En algunas opciones, la muestra de prueba es una biopsia cutánea. En algunas opciones, la muestra de prueba es una muestra del cáncer, tal como una biopsia tumoral. En algunas opciones, los métodos implican actualizar un registro de paciente para el individuo para indicar el resultado diagnóstico de la comparación. En algunas opciones, la determinación comprende detectar en la muestra de prueba un ARNm que está codificado por el gen asociado a CSC. En algunas opciones, la determinación comprende

- 5 detectar en la muestra de prueba un polipéptido que está codificado por el gen asociado a CSC. En determinadas opciones, la detección comprende hibridación de ácido nucleico o amplificación de ácido nucleico. En opciones específicas, la amplificación de ácido nucleico es RT-PCR en tiempo real o RT-PCR. En una opción, la hibridación de ácido nucleico se realiza usando una matriz de ácido nucleico. En otras opciones determinadas, la detección comprende inmunodetección del polipéptido. En una opción, la inmunodetección comprende un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En una opción, la inmunodetección comprende una matriz de anticuerpos. En una opción, la inmunodetección comprende inmunohistoquímica.
- 10 En algunas opciones de los métodos, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia no cancerosa y, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es aproximadamente igual al nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia no cancerosa, entonces la comparación no indica cáncer.
- 15 En algunas opciones de los métodos, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia cancerosa y, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC es aproximadamente igual al nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia cancerosa, entonces la comparación indica cáncer.
- 20 En algunas opciones de los métodos, el gen asociado a CSC está en la tabla 1 u 8 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia no cancerosa y, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es significativamente mayor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia no cancerosa, la comparación indica cáncer.
- 25 En algunas opciones de los métodos, el gen asociado a CSC está en la tabla 1 u 8 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia de cáncer y, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es significativamente menor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia de cáncer, la comparación no indica cáncer.
- 30 En algunas opciones de los métodos, el gen asociado a CSC está en la tabla 1 u 8 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia no cancerosa y, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es al menos 10 % mayor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia no cancerosa, la comparación indica cáncer.
- 35 En algunas opciones de los métodos, el gen asociado a CSC está en la tabla 2 o 7 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia no cancerosa y, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es significativamente menor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia no cancerosa, la comparación indica cáncer.
- 40 En algunas opciones de los métodos, el gen asociado a CSC está en la tabla 2 o 7 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia de cáncer y, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es significativamente mayor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia de cáncer, la comparación no indica cáncer.
- 45 En algunas opciones de los métodos, el gen asociado a CSC está en la tabla 2 o 7 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia no cancerosa y, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es al menos 10 % menor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia no cancerosa, la comparación indica cáncer.
- 50 La divulgación, en algunos aspectos, proporciona métodos para aislar una célula madre cancerosa. En algunos aspectos, los métodos implican poner en contacto una muestra con un agente que se une a un polipéptido, que está codificado por un gen asociado a CSC en la tabla 4 y se expresa en la superficie de la célula madre cancerosa, y aislar el agente de la muestra. Si la muestra contiene la célula madre cancerosa, el agente se une con el polipéptido en la superficie de la célula madre cancerosa de manera que el aislamiento del agente de la muestra dé lugar a aislamiento de la célula madre cancerosa. En algunas opciones, el gen asociado a CSC se selecciona del grupo que consiste en: ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8. En algunas opciones, el agente es un péptido aislado que se une específicamente al polipéptido en la superficie de la célula madre cancerosa. En determinadas opciones, el péptido aislado es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En opciones específicas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo humano, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monocatenario, fragmento F(ab')₂, Fab, Fd, Fv o Fv de cadena sencilla. En algunas opciones, el péptido aislado se une a un soporte sólido. En algunas opciones, el péptido aislado se conjuga con un marcador detectable. En algunas opciones, el marcador detectable es un fluoróforo que puede seleccionarse de: FITC, TRITC, Cy3, Cy5, colorantes fluorescentes Alexa y puntos cuánticos. En algunas opciones, el aislamiento comprende realizar una clasificación de células activadas por fluorescencia para aislar una célula madre cancerosa unida a un marcador detectable. En algunas opciones, la célula madre cancerosa es de un melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon o cáncer renal.
- 65

5 La divulgación, en algunos aspectos, proporciona métodos para tratar a un individuo que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer. En algunos aspectos, los métodos implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que induce la expresión de un gen asociado a CSC seleccionado del grupo expuesto en la tabla 2 o 7. En algunas opciones, el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon o cáncer renal.

10 En algunas opciones, la composición que induce la expresión de un gen asociado a CSC comprende un plásmido aislado que expresa el gen asociado a CSC. En algunas opciones, el plásmido aislado está en un virus capaz de infectar al individuo. En determinadas opciones, el virus se selecciona de adenovirus, retrovirus, lentivirus y virus adenoasociado. En algunas opciones, el plásmido aislado comprende un promotor específico de cáncer unido operativamente con el gen asociado a CSC.

15 La divulgación, en otros aspectos, proporciona métodos para tratar a un individuo que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer que implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que se dirige a un producto de un gen asociado a CSC seleccionado del grupo expuesto en la tabla 1 u 8. En algunas opciones, el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon o cáncer renal. En algunas opciones, el gen asociado a CSC se selecciona del grupo expuesto en la tabla 4. En determinadas opciones, el gen asociado a CSC se selecciona del grupo que consiste en: ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8.

20 En algunas opciones, la composición que se dirige a un producto de un gen asociado a CSC comprende un ácido nucleico pequeño de interferencia que inhibe la expresión del gen asociado a CSC. En algunas opciones, la composición comprende un plásmido aislado que expresa el ácido nucleico pequeño de interferencia. En determinadas opciones, el plásmido está en un virus. En opciones específicas, el virus se selecciona de adenovirus, retrovirus, lentivirus y virus adenoasociado. En determinadas opciones, el plásmido aislado comprende un promotor específico de cáncer unido operativamente con un gen que codifica el ácido nucleico pequeño de interferencia.

30 En algunas opciones, la composición que se dirige a un producto (p. ej., proteína o ARN) de un gen asociado a CSC comprende una molécula aislada que se une selectivamente con un polipéptido codificado por el gen asociado a CSC. En determinadas opciones, la molécula aislada se conjuga con un agente terapéutico. En opciones específicas, la molécula aislada es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En opciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo humano, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, F(ab')₂, Fab, Fd, Fv o fragmento Fv de cadena sencilla. En opciones específicas, el agente terapéutico se selecciona de: una toxina, un ácido nucleico pequeño de interferencia y un agente quimioterapéutico. En una opción, la toxina es un radioisótopo. En opciones particulares, el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en: ²²⁵Ac, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ¹⁸⁶Rh, ¹⁸⁸Rh, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ⁶⁷Cu, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁷Br, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Bo, ⁶⁴Cu, ²¹²Pb, ²²⁴Ra y ²²³Ra. En algunas opciones, el agente terapéutico es un ácido nucleico pequeño de interferencia que inhibe la expresión de un gen asociado a CSC. En algunas opciones, la molécula aislada se une al polipéptido y entra en un compartimento intracelular de una célula madre cancerosa del cáncer.

40 En algunas opciones, los métodos de tratamiento implican determinar el nivel de expresión del gen asociado a CSC en el individuo. En determinadas opciones, los métodos implican comparar el nivel de expresión del gen asociado a CSC con un valor de referencia, en donde los resultados de la comparación son diagnósticos de cáncer en el individuo. En opciones específicas, si la comparación da lugar a un diagnóstico de cáncer en el individuo, se realiza la administración. En una opción, la determinación y la comparación se repiten en uno o más intervalos después de la administración. En algunas opciones, la administración es por vía oral, por vía intravenosa, por vía intrapleural, por vía intranasal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o como un aerosol.

50 La divulgación, en algunos aspectos, proporciona métodos para administrar un agente terapéutico a una célula madre cancerosa que implican poner en contacto una célula madre cancerosa con una molécula aislada, que se une selectivamente con un polipéptido codificado por un gen asociado a CSC seleccionado del grupo expuesto en la tabla 4 y que se conjuga con un agente terapéutico, en una cantidad eficaz para administrar el agente terapéutico a la célula madre cancerosa. En algunas opciones, el gen asociado a CSC se selecciona del grupo que consiste en: ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8. En algunas opciones, la molécula aislada es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une selectivamente al polipéptido. En algunas opciones, el agente terapéutico se selecciona de: una toxina, un ácido nucleico pequeño de interferencia y un agente quimioterapéutico. En una opción, la toxina es un radioisótopo. En opciones particulares, el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en: ²²⁵Ac, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ¹⁸⁶Rh, ¹⁸⁸Rh, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ⁶⁷Cu, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁷Br, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Bo, ⁶⁴Cu, ²¹²Pb, ²²⁴Ra y ²²³Ra. En algunas opciones, el agente terapéutico es un ácido nucleico pequeño de interferencia que inhibe la expresión de un gen asociado a CSC. En algunas opciones, la célula madre cancerosa está *in vitro*. En otras opciones, la célula madre cancerosa está *in vivo*.

65 En algunos aspectos, la divulgación proporciona matrices de ácidos nucleicos que consisten esencialmente en al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300 o más genes asociados a CSC expuestos en la tabla 5.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona matrices de polipéptidos que consisten esencialmente en al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100 o más polipéptidos o fragmentos inmunogénicos de los mismos codificados por genes asociados a CSC expuestos en la tabla 1 u 8.

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona matrices de anticuerpos que consisten esencialmente en al menos 2 o más anticuerpos diferentes o fragmentos de unión a antígeno que se unen selectivamente a polipéptidos codificados por genes asociados a CSC expuestos en la tabla 1 u 8.

10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos para estratificar una población que comprende individuos que tienen cáncer. Los métodos implican determinar los niveles de expresión de al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300 o más genes asociados a CSC expuestos en la tabla 5 y estratificar la población en función de los niveles de expresión.

15 En algunos aspectos, la divulgación proporciona una molécula aislada que se une selectivamente con un polipéptido codificado por un gen asociado a CSC expuesto en la tabla 4 y que se conjuga con un agente terapéutico. En algunas opciones, el gen asociado a CSC se selecciona del grupo que consiste en: ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8. En algunas opciones, el agente terapéutico se selecciona de: una toxina, un ácido nucleico pequeño de interferencia y un agente quimioterapéutico.

20 En determinadas opciones, la molécula aislada es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En determinadas opciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo humano, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monocatenario, un fragmento F(ab')₂, Fab, Fd o Fv. En determinadas opciones, la molécula aislada es un ligando de receptor aislado del polipéptido.

25 La divulgación, en algunos aspectos, proporciona composiciones que comprenden cualquiera de las moléculas aisladas anteriores. En algunas opciones, las composiciones pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La divulgación, en algunos aspectos, proporciona equipos farmacéuticos que incluyen un recipiente que contiene cualquiera de las composiciones anteriores e instrucciones para administrar la composición a un individuo que tiene cáncer.

35 También se proporciona uso de una composición de la divulgación para tratar el cáncer como un aspecto de la divulgación.

También se proporciona un método para fabricar un medicamento de una composición de la divulgación para tratar el cáncer.

40 Cada una de las limitaciones de la divulgación puede abarcar diversas opciones de la divulgación. Se anticipa, por lo tanto, que cada una de las limitaciones de la divulgación que implican un elemento cualquiera o combinaciones de elementos puede incluirse en cada aspecto de la divulgación. La presente invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de componentes expuestos en la descripción a continuación o ilustrados en los dibujos. La divulgación tiene capacidad para otras opciones y puede practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, la fraseología y terminología usadas en el presente documento son para fines de descripción y no deberían considerarse limitantes. Se pretende que el uso de "incluir", "comprender" o "tener", "contener", "implicar" y variaciones de los mismos en el presente documento, abarque los elementos enumerados a continuación y equivalentes de los mismos así como elementos adicionales.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa un análisis de rutas vasculogénicas/angiogénicas en el melanoma humano. La figura 1a. es una representación gráfica de la activación de la ruta a través de MMIC ABCB5⁺. Los genes representados por nodos (círculos grises oscuros, TRIO, MET, FLT1, PSEN1, NRP2, RHOA, PTK2, PIP5K3, KIAA1267, MLL, GABPA, ETS1 y CHD8) se sobreexpresan en células de melanoma humano ABCB5⁺ en relación con ABCB5⁺ y las representadas por nodos negros se expresan a un nivel menor, respectivamente. Las líneas negras entre genes muestran interacciones conocidas. Se anotan las funciones génicas conocidas en la vasculogénesis y la angiogénesis y los genes conocidos como dianas farmacológicas relevantes (líneas grises oscuras). Las relaciones génicas y la distribución de la figura se basan en el análisis de ruta Ingenuity y se proporcionan referencias en otras partes del texto. La figura 1b. muestra la detección de miembros de la ruta vasculogénica/angiogénica por RT-PCR en MMIC ABCB5⁺. La figura 1c. muestra la expresión de la proteína FLT1 (VEGFR-1) en MMIC ABCB5⁺ (arriba) y células de melanoma ABCB5⁻ (abajo) según lo determinado por citometría de flujo de color doble usando selección celular específica del fenotipo ABCB5, con porcentajes medios (media ± e.t.m., n = 6 experimentos repetidos) mostrados a la derecha. La figura 1d. representa tinción por inmunofluorescencia representativa para la expresión de CD144 (tinción con Texas red) por subpoblaciones

de MMIC ABCB5⁺ o células de melanoma ABCB5⁻ antes de (t = 0 h) y tras 48 h de cultivo (t = 48 h) en presencia de VEGF¹¹ 100 ng/ml, con núcleos contrateñidos con DAPI. Los porcentajes medios (media ± e.t.m., n = 3 experimentos repetidos) de células con tinción positiva para CD 144 en cada muestra se muestran a la derecha. La figura 1e. muestra tinción por inmunofluorescencia representativa para la expresión de CD144 (tinción con Texas red) por células de melanoma cultivadas durante 48 h (t = 48 h) en presencia de VEGF 100 ng/ml como anteriormente, pero en presencia o ausencia de mAb de bloqueo anti-FLT1 (VEGFR-1) o mAb de control de isotipo. Los núcleos se contrateñen con DAPI. Los porcentajes medios (media ± e.t.m., n = 3 experimentos repetidos) de células con tinción positiva para CD144 en cada muestra se muestran en el panel del extremo derecho. La figura 1f. muestra formación de tubos detectada por microscopia óptica de contraste de fases de células de melanoma cultivadas durante 24 h (t = 24 h) en presencia de VEGF 100 ng/ml y la presencia o ausencia de mAb de bloqueo anti-FLT1 (VEGFR-1) o mAb de control de isotipo. El número de tubos/campo de microscopia (media ± e.t.m., n = 3 experimentos repetidos) y la longitud del tubo (µm) (media ± e.t.m., n = 3 experimentos repetidos) se ilustran para las diferentes condiciones experimentales en los paneles del extremo derecho, respectivamente. La figura 1g. muestra el potencial de diferenciación adipogénica de células de melanoma humano ABCB5⁺ y ABCB5⁻ (tinción con Oil Red O, los núcleos se contrateñen con hematoxilina). La figura 1h. muestra el potencial de diferenciación osteogénica de células de melanoma humano ABCB5⁺ y ABCB5⁻ (tinción con rojo de alizarina). La figura 1i. muestra el potencial de diferenciación miogénica de células de melanoma humano ABCB5⁺ y ABCB5⁻. Se detecta ausencia de tinción de miogenina (FITC, verde) en células de melanoma humano ABCB5⁺ o ABCB5⁻ (los núcleos se contrateñen con DAPI).

La figura 2 muestra un análisis de vasculogénesis *in vivo* conducido por MMIC. La figura 2a. muestra secciones teñidas de manera convencional (H y E) de melanoma humano que crece en el sitio de inyección de células de melanoma dentro de la dermis humana de xenoinjerto de piel en ratón NOD/SCID. La figura 2b. muestra inmunohistoquímica para CD31 humano que indica la respuesta angiogénica en el perímetro del melanoma dentro del xenoinjerto humano; la línea discontinua representa la interfaz del nódulo tumoral con tejido conectivo dérmico. La figura 2c. muestra tinción inmunohistoquímica de PAS (con diastasa) de regiones interiores negativas para CD31 de xenoinjerto de melanoma que revela numerosos canales de anastomosis (el recuadro es inmunohistoquímica de laminina que indica un patrón idéntico). La figura 2d. muestra microfotografías electrónicas de transmisión de regiones interiores de xenoinjerto de melanoma; los espacios luminales que contienen productos sanguíneos (eritrocitos) están revestidos por células de melanoma y una matriz extracelular de tipo membrana basal asociada. La figura 2e. muestra la zona interior del xenoinjerto de melanoma procedente de células que expresan transgén de GFP y teñido de manera inmunohistoquímica con respecto al marcador endotelial CD144 (cromógeno FAST RED (SIGNET) de Covance Research Products, Inc); la expresión de CD144 se limita a células que forman espacios de tipo luz revestidos por células que coexpresan GFP y CD144 (indicado por tinción doble). La figura 2f y g. muestran aumentos bajos (f) y altos (g) de inmunohistoquímica para proteína ABCB5; la reactividad está restringida a canales de anastomosis idénticos a los vistos en el panel c. El recuadro en el panel f representa una formación similar de canales reactivos a ABCB5 en una biopsia de melanoma procedente de paciente. La figura 2h. representa la hibridación *in situ* para ARNm de ABCB5 que revela un patrón de canal correspondiente al de la expresión de la proteína ABCB5 (compárese con el panel f; el recuadro es control con sentido). La figura 2i. muestra la detección de mAb anti-ABCB5 usando inmunohistoquímica de Ig anti-ratón en xenoinjertos de melanoma después de la administración intravenosa *in vivo*; obsérvese la localización en canales (el recuadro representa la tinción de anti-Ig de ratón después de la administración intravenosa de mAb de control de isotipo coincidente irrelevante). La figura 2j. muestra microscopia de inmunofluorescencia de marcaje doble para ABCB5 (panel izquierdo), CD144 (panel central) y ABCB5 y CD144 (panel derecho). La figura 2k. muestra microscopia de inmunofluorescencia de marcaje doble para ABCB5 (panel izquierdo), TIE-1 (panel central) y ABCB5 y TIE-1 (panel derecho).

La figura 3 representa la interdependencia de vasculogénesis y tumorigénesis impulsada por MMIC. La figura 3a. muestra la expresión representativa de ABCB5 por citometría de flujo o la tinción de control (FITC, F11) representada frente a la dispersión directa (FSC) para A375 humano, Inóculos de células de melanoma MUM-2B y MUM-2C. La figura 3b. muestra secciones histológicas representativas de melanomas que se desarrollaron a partir de tres líneas celulares de melanoma no segregadas y empobrecidas en ABCB5 inyectadas por vía intradérmica en xenoinjertos de piel humana. La figura 3c. muestra la tasa de formación de tumor determinada histológicamente (%) 3 semanas después del trasplante intradérmico de células de melanoma A375, MUM-2B o MUM-2C humanas no segregadas frente a empobrecidas en ABCB5⁺ (2×10^6 /inóculo) en piel humana/ratones quiméricos Rag2^{-/-} (n = 5, respectivamente). La figura 3d. muestra volúmenes histológicos tumorales (media ± e.t.m.) 3 semanas después del trasplante intradérmico de células de melanoma A375, MUM-2B o MUM-2C humanas no segregadas frente a empobrecidas en ABCB5⁺ (2×10^6 /inóculo) en piel humana/ratones quiméricos Rag2^{-/-}. La figura 3e. muestra la inmunohistoquímica para laminina que revela el grado de formación de canales en melanomas que se desarrollaron a partir de inóculos de células de melanoma no segregadas o empobrecidas en ABCB5⁺ procedentes de las líneas A375, MUM-2B o MUM-2C inyectadas por vía intradérmica en xenoinjertos de piel humana (flechas = necrosis). La figura 3f. representa el análisis de imágenes de la inmunoreactividad de laminina para melanomas procedentes de inóculos de células de melanoma no segregadas y empobrecidas en ABCB5⁺; el eje y es el porcentaje del área pixelada con reactividad (media ± e.t.m.); la barra rellena representa tumores procedentes de células de melanoma no segregadas, las barras vacías representan tumores procedentes de células empobrecidas en ABCB5⁺ (A375, $P < 0,0032$; MUM-2B, $P < 0,0005$; MUM-2C, $P < 0,0059$).

La figura 4 representa un análisis de la correlación de la proteína ABCB5 y la expresión de ARNm entre líneas celulares de melanoma humano. La figura 4a. muestra transferencias de Western de ABCB5 y expresión de tubulina de un panel de líneas celulares de melanoma humano. La figura 4b. muestra la expresión relativa de ARNm de ABCB5 (\log_2) en un panel de líneas celulares de melanoma humano representadas frente a la expresión de la proteína ABCB5 según lo determinado por las relaciones de intensidad de banda de transferencia de Western de 89 kD de ABCB5 e intensidad de banda de transferencia de Western de tubulina para cada línea celular de melanoma humano. Los puntos de datos en la figura 4b son: 1, SK-MEL-2; 2, SK-MEL-5; 3, SK-MEL-28; 4, MDA-MB-435; 5, UACC-62; 6, UACC-257; 7, M14; 8, MALME-3M. r, r de correlación de rangos de Spearman (corregido con respecto a empates).

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere en parte al descubrimiento de que numerosos genes asociados a CSC han alterado la expresión o función en células madre cancerosas, p. ej., células madre de melanoma. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a matrices de diagnóstico y métodos para detectar cáncer, p. ej., melanoma, en un individuo en función de la expresión de genes asociados a CSC. En otros aspectos, la divulgación se refiere a composiciones, equipos y métodos útiles para tratar individuos que tienen cáncer. En algunas opciones, los métodos de tratamiento implican la modulación, p. ej., inducción o inhibición, de la actividad de los genes asociados a CSC. Los genes asociados a CSC pueden ser modulados por una cualquiera de varias maneras conocidas en la técnica y descritas en el presente documento, p. ej., sobreexpresión, inhibición basada en ARNi, etc. En algunos casos, los genes asociados a CSC codifican proteínas de la superficie celular que, cuando se regulan positivamente en células madre cancerosas, pueden ser diana selectiva para aislamiento, p. ej., mediante citometría de flujo, identificación, p. ej., mediante inmunomarcaje y destrucción de células madre cancerosas, p. ej., células madre de melanoma.

El mecanismo por el que las CSC provocan la formación y el crecimiento de tumores y la posible función de la plasticidad de diferenciación específica de CSC en la tumorigenicidad son actualmente desconocidos. Según la divulgación, se ha demostrado que las CSC desempeñan una función importante en el suministro de apoyo nutricional a los tumores en crecimiento. Por ejemplo, los inventores han mostrado en el presente documento (ejemplos) una capacidad selectiva de células iniciadoras de melanoma maligno ABCB5⁺ (MMIC)³ para experimentar diferenciación vasculogénica y generar canales similares a vasos perfundidos con sangre *in vivo*. Se identificó un repertorio de genes expresados diferencialmente en MMIC en comparación con poblaciones tumorales generales mediante análisis de micromatrices en subconjuntos de células purificadas ABCB5⁺ y ABCB5⁻ procedentes de las líneas celulares de melanoma humano establecidas y de tres muestras de melanoma procedentes de pacientes separadas. Usando este enfoque, se identificaron 399 genes que se expresaban diferencialmente entre MMIC ABCB5⁺ y poblaciones de melanoma generales ABCB5⁻. Los genes, que se presentan en las tablas 1-8, se denominan en el presente documento genes asociados a CSC. De los genes asociados a CSC, 265 estaban regulados positivamente (tabla 1; la tabla 1 incluye la tabla 1.1 y la tabla 1.2) y 150 estaban regulados negativamente (tabla 2). Para determinados genes asociados a CSC, se identifican la ubicación subcelular, p. ej., membrana plasmática, núcleo, etc., tipo de gen, p. ej., enzima, complejo, transportador, etc., y fármacos que afectan, p. ej., se dirigen, a su actividad (tabla 3). En la tabla 3 se proporciona un resumen de esas anotaciones y redes. Los genes que actúan comparten una designación de ruta común (tienen una "red" común) en la tabla 3. Algunos genes asociados a CSC, p. ej., los que tienen anotaciones de "membrana plasmática", codifican proteínas que están asociadas con la superficie celular. Dichas proteínas de la superficie celular son útiles de diversas maneras. Por ejemplo, las proteínas de la superficie celular que están reguladas positivamente en células madre cancerosas, puede ser dianas selectivas, p. ej., usando los métodos desvelados en el presente documento, para aislar, identificar y destruir células madre cancerosas. En la tabla 4 se proporciona un listado de proteínas de la superficie celular ilustrativas codificadas por genes asociados a CSC.

Tabla 1.1: Genes asociados a CSC regulados positivamente (p < 0,05)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
HECW1	237295_at	11,843
RP11-139H14.4	1569124_at	11,472
CDC16	242359_at	6,261
ANK2	202921_s_at	4,162
LOC146325	1553826_a_at	3,943
UGT1A6	206094_x_at	3,86
C12ORF51	1557529_at	3,632
SNRPA1	242146_at	3,54

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
PDE4B	215671_at	3,457
PAPD4	222282_at	3,39
ZNF536	233890_at	3,303
KSR2	230551_at	3,211
BUB1	233445_at	3,209
ZNF292	236435_at	3,201
CABIN1	1557581_x_at	3,052
SDAD1	242190_at	3,009
ASCC3L1	214982_at	3,009
ZNF224	216983_s_at	2,986
KIDINS220	1557246_at	2,97
WIPF2	216006_at	2,916
C12ORF51	230216_at	2,874
VPS37B	236889_at	2,85
NARG1	1556381_at	2,827
LOC145757	1558649_at	2,779
SDCCAG8	243963_at	2,67
ZNF154	242170_at	2,667
ZFR	238970_at	2,655
TRPV1	1556229_at	2,636
ANAPC5	235926_at	2,631
CUL4A	232466_at	2,607
TRIO	240773_at	2,607
LOC283888	1559443_s_at	2,56
RAB11FIP3	228613_at	2,546
PTK2	234211_at	2,539
MYO10	243159_x_at	2,528
NAT8B	206964_at	2,513
CDC14B	234605_at	2,512
TRIM33	239716_at	2,496
SF1	210172_at	2,452
SGCA	1562729_at	2,395
LOC285147	236166_at	2,377
N4BP2L2	242576_x_at	2,349
HNRPH1	213472_at	2,332
FLJ10357	241627_x_at	2,31

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
PHF20L1	219606_at	2,3
ANKRD28	241063_at	2,297
TRNT1	243236_at	2,295
GOLGA8A	213650_at	2,289
KIAA1618	231956_at	2,27
RBM5	209936_at	2,249
LOC645513	239556_at	2,24
LOC729397	236899_at	2,231
PABPN1	213046_at	2,228
SVIL	215279_at	2,228
PIP5K3	1557719_at	2,227
STRAP	1558002_at	2,189
KIAA2013	1555933_at	2,18
NUPL1	241425_at	2,179
IFNGR1	242903_at	2,171
AKAP9	215483_at	2,168
LOC254128	1557059_at	2,164
IRS2	236338_at	2,162
RHOA	240337_at	2,143
JARID2	232835_at	2,139
GPD2	243598_at	2,13
RADIL	223693_s_at	2,126
CROP	242389_at	2,121
EXT1	242126_at	2,116
XRCC5	232633_at	2,106
PDXDC1	1560014_s_at	2,105
MEF2C	236395_at	2,104
ZNF567	242429_at	2,103
ZNF337	1565614_at	2,096
TLL4	1557611_at	2,092
FUBP1	240307_at	2,087
NPTN	228723_at	2,086
TPM4	235094_at	2,079
NCKAP1L	209734_at	2,071
KRTAP19-1	1556410_a_at	2,07
SLC30A9	237051_at	2,063
HDAC3	240482_at	2,062

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
C10ORF18	244165_at	2,046
SMA4	238446_at	2,035
GBF1	233114_at	2,03
GABPA	243498_at	2,03
SFRS15	243759_at	2,028
CREB3L2	237952_at	2,013
SLC2A8	239426_at	2,012
N4BP2L1	213375_s_at	2,01
IDS	1559136_s_at	2,001
COBRA1	1556434_at	1,985
TXNL1	243664_at	1,98
LOC388135	230475_at	1,979
MTUS1	239576_at	1,975
TAF15	227891_s_at	1,971
HNRPD	241702_at	1,962
TRIM46	238147_at	1,96
NBR1	1568856_at	1,957
WDR68	233782_at	1,924
HNRPD	235999_at	1,92
BLID	239672_at	1,91
LOC145786	229178_at	1,907
HOXD3	206601_s_at	1,897
AOC3	204894_s_at	1,894
PRPF38B	230270_at	1,888
SLC20A1	230494_at	1,884
SEC16B	1552880_at	1,877
FLT1	232809_s_at	1,861
HUWE1	214673_s_at	1,858
BUB1	216277_at	1,856
GPR135	241085_at	1,851
PSEN1	242875_at	1,851
KIAA0907	230028_at	1,83
POLR2J2	1552622_s_at	1,828
SFRS15	222311_s_at	1,818
CBS	240517_at	1,818
ETS1	241435_at	1,797
LRRFIP1	239379_at	1,796

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
OCIAD1	235537_at	1,794
LRCH3	229387_at	1,793
CCDC14	240884_at	1,771
HNRNPC	235500_at	1,769
DCUN1D2	240478_at	1,76
NPAS2	1557690_x_at	1,76
POFUT2	207448_at	1,759
CHD2	244443_at	1,757
TMEM165	1560622_at	1,756
FLJ31306	239432_at	1,753
HPS1	239382_at	1,749
WTAP	1560274_at	1,747
TNPO1	1556116_s_at	1,739
ZFH3	215828_at	1,737
AKR1CL2	1559982_s_at	1,732
C20ORF4	234654_at	1,731
CCDC57	214818_at	1,703
MALAT1	224568_x_at	1,699
EWSR1	229966_at	1,686
MYO10	244350_at	1,677
MALAT1	223940_x_at	1,659
ATXN2L	207798_s_at	1,656
PDK1	239798_at	1,654
POLR2J2	1552621_at	1,652
CENPJ	220885_s_at	1,64
PDSS1	236298_at	1,64
UNK	1562434_at	1,637
BDP1	224227_s_at	1,632
N4BP2L2	235547_at	1,631
MDM4	235589_s_at	1,629
SNORA28	241843_at	1,628
ZFX	207920_x_at	1,625
NAPA	239362_at	1,624
PRO1073	228582_x_at	1,607
MLL	212079_s_at	1,599
SGOL2	235425_at	1,591
RBM25	1557081_at	1,57

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
BARD1	205345_at	1,559
LOC388969	232145_at	1,555
GGT1	211417_x_at	1,555
FAM62C	239770_at	1,551
TTC9C	1569189_at	1,55
TCAG7.907	238678_at	1,546
OSGEP	242930_at	1,541
RHOBTB2	1556645_s_at	1,538
C5ORF24	229098_s_at	1,531
RBM4	213718_at	1,53
SLC2A11	232167_at	1,529
DDX17	213998_s_at	1,528
C22ORF30	216555_at	1,521
C9ORF85	244160_at	1,52
DNM1L	236032_at	1,503
SOLE	213577_at	1,502
CRIPAK	228318_s_at	1,486
ZNF800	227101_at	1,484
RAD54L	204558_at	1,483
TAF1B	239046_at	1,468
THRAP3	217847_s_at	1,464
CNIH3	232758_s_at	1,451
UQCC	229672_at	1,451
HOXA2	228642_at	1,44
RBM26	229433_at	1,43
RFT1	240281_at	1,426
MTERFD3	225341_at	1,422
LOC641298	208118_x_at	1,419
ZNF326	241720_at	1,418
NBPF16	201104_x_at	1,411
ASPM	232238_at	1,411
RNF43	228826_at	1,401
IPW	213447_at	1,399
TTC3	208664_s_at	1,396
USP36	224979_s_at	1,393
KIAA0841	36888_at	1,389
NEK1	213328_at	1,381

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
AMZ2	227567_at	1,377
TBC1D8	204526_s_at	1,373
STK36	231806_s_at	1,362
SF3B1	214305_s_at	1,359
HELLS	242890_at	1,359
SYNE2	202761_s_at	1,356
KIAA1267	224489_at	1,355
C14ORF135	1563259_at	1,353
SF3B1	201070_x_at	1,35
CLN8	229958_at	1,344
STK36	234005_x_at	1,335
ZNF226	219603_s_at	1,332
COQ4	218328_at	1,328
DTX3	49051_g_at	1,32
WFS1	1555270_a_at	1,315
ZNF251	226754_at	1,313
ARS2	201679_at	1,307
ATAD2	235266_at	1,304
CCDC73	239848_at	1,294
BCL9L	227616_at	1,291
MET	213816_s_at	1,283
NFATC2IP	217527_s_at	1,272
CHD8	212571_at	1,27
TNRC6A	234734_s_at	1,268
OSBPL5	233734_s_at	1,261
COIL	203653_s_at	1,259
CPEB2	226939_at	1,251
TBC1D8	221592_at	1,246
RUNX3	204198_s_at	1,233
LBA1	213261_at	1,225
CENPJ	234023_s_at	1,22
MARCH6	201737_s_at	1,219
ANKRD44	226641_at	1,218
NAPE-PLD	242635_s_at	1,216
C12ORF48	220060_s_at	1,216
CCDC93	219774_at	1,208
ZUFSP	228330_at	1,205

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
SMC6	218781_at	1,203
TAOK3	220761_s_at	1,195
JARID1A	226367_at	1,192
DCLRE1C	242927_at	1,187
TTC26	233999_s_at	1,184
EIF4G3	201935_s_at	1,174
ORMDL1	223187_s_at	1,171
TCOF1	202385_s_at	1,169
CCDC52	234995_at	1,166
PMS2L3	214473_x_at	1,159
HERC5	219863_at	1,156
CASC5	228323_at	1,144
SON	201085_s_at	1,144
APBB2	40148_at	1,139
LOC338799	226369_at	1,137
PHC1	218338_at	1,123
DEPDC1	232278_s_at	1,119
NRP2	210841_s_at	1,106
ZMYND8	209049_s_at	1,102
CEP55	218542_at	1,096

Tabla 1,2: Genes muy regulados positivamente según lo detectado por RT-PCR

Descripción	NombreG	Factor de cambio de ABCB5 ⁺ /ABCB5 ⁻
Tipo angiopoyetina 3	ANGPT5	3,0596
Inhibidor de la angiogénesis específica del cerebro 1	FLJ41988	3,0596
Cadherina 5, tipo 2, VE-cadherina (epitelio vascular)	7B4/CD144	3,0596
Factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)	HOMG4/URG	187,8365
Factor de crecimiento inducido por C-fos (factor de crecimiento endotelial vascular D)	VEGF-D/VEGFD	3,5884
Factor de crecimiento de hepatocitos (hepapoyetina A; factor de dispersión)	F-TCF/HGFB	4,542
Heparanasa	HPA/HPR1	286,6871
Factor de crecimiento insulínico 1 (somatomedina C)	IGFI	4,7022
Jagged 1 (síndrome de Alagille)	AGS/AHD	1566,5046
Laminina, alfa 5	KIAA1907	3,8727
Molécula de adhesión a plaquetas/células endoteliales (antígeno CD31)	CD31/PECAM-1	11,9037
Que contiene dominio de plexina 1	DKFZp686F0937/TEM3	3,4184

(continuación)

Descripción	NombreG	Factor de cambio de ABCB5+/ABCB5-
Estabilina 1	CLEVER-1/FEEL-1	4,357
Factor de crecimiento transformante, alfa	TFGA	3549,3357
Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	DIF/TNF-alfa	4,0652
Factor de crecimiento endotelial vascular C	Fit4-L/VRP	446,7529

Tabla 2: Genes asociados a CSC regulados negativamente ($p < 0,05$)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
ECHDC1	233124_s_at	0,943
DARS	201624_at	0,928
GALNT1	201722_s_at	0,926
CGGBP1	224600_at	0,913
CSE1L	201112_s_at	0,911
GMFB	202544_at	0,904
RPL7L1	225515_s_at	0,899
SKP1	200718_s_at	0,898
IGHMBP2	215980_s_at	0,893
LOC137886	212934_at	0,886
CSE1L	210766_s_at	0,885
ERRFI1	224657_at	0,881
MAP2K4	203266_s_at	0,881
TNFAIP1	201207_at	0,88
TBXA2R	207554_x_at	0,877
SEPHS1	208940_at	0,875
IPO7	200993_at	0,875
C16ORF63	225087_at	0,872
INSIG2	209566_at	0,872
TFB1M	228075_x_at	0,87
PAK1	226507_at	0,869
C14ORF156	221434_s_at	0,867
SMYD2	212922_s_at	0,867
ENTPD5	231676_s_at	0,867
PPP3CA	202457_s_at	0,867
MBNL1	201152_s_at	0,867
MRPL42	217919_s_at	0,866
SUPT7L	201838_s_at	0,865
PMP22	210139_s_at	0,865
GABARAPL2	209046_s_at	0,863

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
PITPNA	201190_s_at	0,863
C2ORF30	224630_at	0,851
TXNDC12	223017_at	0,849
POP4	202868_s_at	0,847
MRPL51	224334_s_at	0,846
AK3	224655_at	0,845
GPR107	211979_at	0,843
TMEM126B	221622_s_at	0,843
PSMA2	201316_at	0,839
KIAA1737	225623_at	0,837
TRAPPC2L	218354_at	0,837
RLBP1L1	224996_at	0,835
CCDC127	226515_at	0,835
CPNE3	202119_s_at	0,833
HIAT1	225222_at	0,832
MECR	218664_at	0,832
ACBD6	225317_at	0,83
SLC16A1	202235_at	0,83
ANXA4	201302_at	0,83
DNAJC21	230893_at	0,829
C22ORF28	200042_at	0,829
SPOPL	225659_at	0,828
PDHB	211023_at	0,827
EIF2S1	201144_s_at	0,824
LOC645166	228158_at	0,823
CAMK2D	225019_at	0,823
LIMS1	212687_at	0,822
VTI1B	209452_s_at	0,821
YY1	224711_at	0,821
TRAPPC2	219351_at	0,821
LOC126917	225615_at	0,819
STX8	204690_at	0,819
NANP	228073_at	0,817
NDFIP1	217800_s_at	0,815
UBE3C	1560739_a_at	0,815
KPNA6	226976_at	0,814

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
C19ORF42	219097_x_at	0,813
DHX40	218277_s_at	0,812
NUCB2	203675_at	0,812
RAB1A	213440_at	0,81
USP8	229501_s_at	0,808
MAP1LC3B	208785_s_at	0,808
PDHB	208911_s_at	0,807
SH2B3	203320_at	0,806
PPP1R3D	204554_at	0,805
DEGS1	209250_at	0,804
HSDL2	209513_s_at	0,803
LOC203547	225556_at	0,802
CANX	238034_at	0,8
PSMA3	201532_at	0,798
PIGY	224660_at	0,793
CYB5R3	1554574_a_at	0,793
BRI3	223376_s_at	0,792
CREB1	204313_s_at	0,791
LOC389203	225014_at	0,79
WDR41	218055_s_at	0,789
C9ORF78	218116_at	0,789
GNPDA1	202382_s_at	0,787
RPE	225039_at	0,787
HSPA4L	205543_at	0,786
SEPT11	201307_at	0,784
HEATR2	241352_at	0,784
ENAH	222433_at	0,783
MED19	226300_at	0,782
TBC1D5	201814_at	0,782
EMP2	225079_at	0,781
STX11	235670_at	0,778
ANKH	229176_at	0,776
ENDOD1	212573_at	0,775
IL13RA1	201887_at	0,775
RAB14	200927_s_at	0,772
TMEM30A	232591_s_at	0,771

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
DDX52	212834_at	0,771
PTPMT1	229535_at	0,769
SRPRB	218140_x_at	0,767
FAM98A	212333_at	0,767
SRP72	208803_s_at	0,766
RPE	221770_at	0,766
HOXB9	216417_x_at	0,766
MAEA	207922_s_at	0,765
GHITM	1554510_s_at	0,764
CAPZB	201949_x_at	0,764
ANKRD52	228257_at	0,762
MOBKL1B	214812_s_at	0,762
MIA3	1569057_s_at	0,759
UBE2E3	210024_s_at	0,758
CAMK2D	228555_at	0,758
UBXD7	212840_at	0,754
C180RF10	213617_s_at	0,754
HSD17B1	228595_at	0,753
PDLIM5	212412_at	0,752
SRP72	208801_at	0,751
ZNF618	226590_at	0,75
TSPAN31	203227_s_at	0,744
MAP3K15	200979_at	0,741
C18ORF10	212055_at	0,737
ATP5I	207335_x_at	0,737
TOX4	201685_s_at	0,73
TBXA2R	336_at	0,73
COL4A2	211966_at	0,729
TIMM23	218119_at	0,723
NDUFAF2	228355_s_at	0,722
FOXN3	218031_s_at	0,721
EIF2S1	201142_at	0,717
NDUFB6	203613_s_at	0,712
TM6SF1	1558102_at	0,704
ELOVL2	213712_at	0,699
PPP1R7	201213_at	0,698

ES 2 796 111 T3

(continuación)

SÍMBOLO GÉNICO	ID	Factor de cambio
BAT3	230513_at	0,697
ZNF668	219047_s_at	0,691
ERBB3	1563253_s_at	0,691
C12ORF45	226349_at	0,688
PGRMC2	213227_at	0,686
NUDT4	212183_at	0,685
AABHD7	239579_at	0,661
CEP27	228744_at	0,651
RAB11FIP3	216043_x_at	0,551
FHL3	218818_at	0,546
NAALAD2	1554506_x_at	0,464
LOC219731	1557208_at	0,419

Tabla 3: Anotaciones de genes de CSC

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
Actina		--		1	Desconocida	grupo	
ADA	100	--		8	Citoplasma	enzima	pentostatina, vidarabina
Proteína adaptadora 2		--		8	Desconocida	complejo	
AFP	174	--		5	Espacio extracelular	transportador	
AGT	183	--		8	Espacio extracelular	otro	
AHR	196	--		7	Núcleo	receptor nuclear dependiente de ligando	
AKAP9	10142	215483_at	2,168	1	Citoplasma	otro	
Akt				2	Desconocida	grupo	
aminoácidos		--		6	Desconocida	químico - endógeno de mamífero	
AMPH	273	--		8	Membrana plasmática	otro	
AMZ2	51321	227567_at	1,377	8	Desconocida	otro	
ANAPC1	64682	--		4	Núcleo	otro	
ANAPC10	10393	--		4	Núcleo	enzima	
ANAPC11	51529	--		4	Desconocida	enzima	
ANAPC13	25847	--		4	Desconocida	otro	
ANAPC2	29882	--		4	Núcleo	enzima	
ANAPC4	29945	--		4	Desconocida	enzima	
ANAPC5	51433	235926_at	2,631	4	Núcleo	enzima	
ANAPC7	51434	--		4	Desconocida	otro	
ANK2	287	202921_s_at	4,162	4	Membrana plasmática	otro	
ANKRD28	23243	241063_at	2,297	13	Desconocida	otro	
AOC3	8639	204894_s_at	1,894	2	Membrana plasmática	enzima	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
AP2A2	161	--		8	Citoplasma	transportador	
APBB2	323	40148_at	1,139	9	Citoplasma	otro	
APP	351	--		9	Membrana plasmática	otro	AAB-001
ARD1A	8260	--		8	Núcleo	enzima	
Aif		--		8	Desconocida	grupo	
ARF5	381	--		8	Citoplasma	transportador	
ARHGDB	397	--		7	Citoplasma	otro	
ASCC3L1 (incluye EG:23020)	23020	214982_at	3,009	9	Núcleo	enzima	
ASCL1	429	--		9	Núcleo	regulador de la transcripción	
ASPM	259266	232238_at	1,411	3	Núcleo	otro	
ATAD2	29.028	235266_at	1,304	7	Desconocida	otro	
ATP		--		9	Desconocida	químico - endógeno de mamífero	
ATXN2L	11273	207798_s_at	1,656	9	Desconocida	otro	
BARD1	580	205345_at	1,559	1	Núcleo	regulador de la transcripción	
BCL2	596	--		6	Citoplasma	otro	oblimersen, (-)-gospipol
BCL9L	283149	227616_at	1,291	6	Citoplasma	otro	
BDP1	55814	224227_s_at	1,632	9	Núcleo	regulador de la transcripción	
beta-estradiol		--		3	Desconocida	químico - endógeno de mamífero	
BRF1	2972	--		9	Núcleo	regulador de la transcripción	
BUB1 (incluye EG:699)	699	233445_at	3,209	5	Núcleo	cinasa	
BUB1B	701	--		4	Núcleo	cinasa	
C120RF48	55010	220060_s_at	1,216		Desconocida	otro	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
C120RF51	283450	1557529_at	3,632	4	Desconocida	otro	
CABIN1	23523	1557581_x_at	3,052	1	Núcleo	otro	
Calmodulina		--		1	Desconocida	grupo	
CASC5	57082	228323_at	1,144	3	Núcleo	otro	
CASP3	836			4	Citoplasma	peptidasa	IDN-6556
CASP6	839	--		9	Citoplasma	peptidasa	
CBS	875	240517_at	1,818	1	Citoplasma	enzima	
CD151	977	--		7	Membrana plasmática	otro	
CDC14B	8555	234605_at	2,512	5	Núcleo	fosfatasa	
CDC16	8881	242359_at	6,261	4	Núcleo	otro	
CDC20	991	--		3	Núcleo	otro	
CDC23 (incluye EG:8697)	8697	--		4	Núcleo	enzima	
CDC26	246184	--		4	Núcleo	otro	
CDC27	996	--		4	Núcleo	otro	
CDC5L	988	222179_at	1,292	9	Núcleo	otro	
CDK2	1017	--		7	Núcleo	cinasa	BMS-387032, flavopiridol
CDKN1A	1026	--		7	Núcleo	cinasa	
CDT1	81620	--		7	Núcleo	otro	
CDX1	1044	--		9	Núcleo	regulador de la transcripción	
CENPJ	55835	220885_s_at	1,64	4	Núcleo	regulador de la transcripción	
CEP55	55165	218542_at	1,096	5	Desconocida	otro	
CHD8	57680	212571_at	1,27	1	Núcleo	enzima	
CHEK2	11200	--		5	Núcleo	cinasa	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
CHRM3	1131	--		8	Membrana plasmática	Receptor acoplado a proteína G	fesoterodina, ABT-089, atropina/edrofonio, ciclopentolato/fenilefrina, ipratropio/albuterol, trihexifenidilo, carbamilcolina, darifenacina, metacolina, difenhidramina, quinidina, prociclidina, tropio, sulfato de atropina/ácido benzoico/hiosciamina/metenammina/azul de metileno/salicilato de fenilo, homatropina, dicitolmina, metantelina, orfenadrina, fluoxetina/olanzapina, doxacurio, aspirina/cafeína/orfenadrina, propantelina, tridihexetilo, biperideno, metilbromuro de anisotropina, glicopirrolato, difenhidramina/8-cloroteofilina, atropina/hiosciamina e/fenobarbital/escopolamina, sulfato de atropina/clorhidrato de difenoxilato, pipercuronio, flavoxato, clorfeniramina/metoscopolamina/fenilefrina, ácido mepenzólico, sulfato de atropina/clorhidrato de difenoxina, metilbromuro de homatropina, hidroxianfetamina/tropicamida, cisatracurio, hiosciamina/fenobarbital, betanecol, olanzapina, oxibutinina, tropicamida, solifenacina, ciclopentolato, tolterodina, cevimeline, acetilcolina, ipratropio, atropina, pilocarpina, benzatropina, hiosciamina, arecolina, escopolamina, N-metilescopolamina, tiotropio, carbinoxamina, buclicina, difenhidramina/fenilefrina, bromfeniramina
CIB1	10519	--		7	Núcleo	otro	
CK2		--		1	Desconocida	complejo	
CKM	1158	--		5	Citoplasma	cinasa	
CLIC1	1192	--		9	Núcleo	canal iónico	
CLIC4	25.932	--		6	Citoplasma	canal iónico	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
CLIC5	53405	--		1	Citoplasma	canal iónico	
CLN8	2055	229958_at	1,344		Citoplasma	otro	
COIL	8161	203653_s_at	1,259	6	Núcleo	otro	
COL4A1	1282	--		5	Espacio extracelular	otro	colagenasa
COPB1	1315	--		8	Citoplasma	transportador	
Creb		--		2	Desconocida	grupo	
CREB3L2	64764	237952_at	2,013	3	Desconocida	otro	
CRIPAK	285464	228318_s_at	1,486		Citoplasma	otro	
CROP	51747	242389_at	2,121	7	Núcleo	otro	
CRY1	1407	--		7	Núcleo	enzima	
CTNNA1	1495	--		6	Membrana plasmática	otro	
CTNNAL1	8727	--		6	Membrana plasmática	otro	
CTNNB1	1499	--		6	Núcleo	regulador de la transcripción	
CUL4A	8451	232466_at	2,607	1	Núcleo	otro	
DAPK1	1612	--		6	Citoplasma	cinasa	
DCLRE1C	64421	242927_at	1,187		Núcleo	enzima	
DDX17	10521	213998_s_at	1,528	6	Núcleo	enzima	
DENND4A	10260	230607_at	2,368	1	Núcleo	otro	
DMD	1756	--		8	Membrana plasmática	otro	
DNM1L	10059	236032_at	1,503	2	Citoplasma	enzima	
DSN1	79980	--		3	Núcleo	otro	
DTX		--		3	Desconocida	grupo	
DTX1	1840	--		3	Núcleo	regulador de la transcripción	
DTX2	113878	--		3	Núcleo	otro	
DTX3	196403	49051_g_at	1,32	3	Citoplasma	otro	

(continuación)

Nombre	Entrez GenID para ser humano	Affymatrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
DUB	--	--		18	Desconocida	grupo	
DVL1	1855	--		6	Citoplasma	otro	
DVL2	1856	--		6	Citoplasma	otro	
Dinamina	--	--		2	Desconocida	grupo	
EGFR	1956	--		7	Membrana plasmática	cinasa	cetuximab, AEE 788, panitumumab, BMS-599626, ARRY-334543, XL647, canertinib, gefitinib, HKI-272, PD 153035, lapatinib, vandetanib, erlotinib
EIF4G3	8672	201935_s_at	1,174	4	Citoplasma	regulador de la traducción	
EPOR	2057	--		9	Membrana plasmática	receptor transmembrana	eritropoyetina, darbeopetina alfa, activador continuo del receptor de eritropoyetina
ERBB2	2064	--		3	Membrana plasmática	cinasa	trastuzumab, BMS-599626, ARRY-334543, XL647, CP-724.714, HKI-272, lapatinib, erlotinib
ETS1	2113	241435_at	1,797	2	Núcleo	regulador de la transcripción	
EWSR1	2130	229966_at	1,686	1	Núcleo	otro	
EXT1	2131	242126_at	2,116	4	Citoplasma	enzima	
FLOT1	10211	--		3	Membrana plasmática	otro	
FLT1	2321	232809_s_at	1,861	2	Membrana plasmática	cinasa	sunitinib, axitinib, CEP 7055
FMR1	2332	--		7	Núcleo	otro	
FRK	2444	--		9	Núcleo	cinasa	
FUBP1	8880	240307_at	2,087	1	Núcleo	regulador de la transcripción	
FZR1	51343	--		4	Núcleo	otro	
GABPA	2551	243498_at	2,03	2	Núcleo	regulador de la transcripción	
GBF1	8729	233114_at	2,03	8	Citoplasma	otro	
GGT1	2678	211417_x_at	1,555	6	Citoplasma	enzima	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
GPD2	2820	243598_at	2,13	3	Citoplasma	enzima	
HDAC3	8841	240482_at	2,062	1	Núcleo	regulador de la transcripción	tributirina, PXD101, piroxamida, MGCD0103, vorinostat, FR 901228
HECW1	23072	237295_at	11,843	6	Citoplasma	enzima	
HELLS	3070	242890_at	1,359	3	Núcleo	enzima	
HERC5	51191	219863_at	1,156	6	Citoplasma	enzima	
Histona h3	--	--	--	1	Desconocida	grupo	
HNRNPC	3183	235500_at	1,769	1	Núcleo	otro	
HNRPD	3184	241702_at	1,962	4	Núcleo	regulador de la transcripción	
HNRPH1	3187	213472_at	2,332	8	Núcleo	otro	
HOXA2	3199	228642_at	1,44	8	Núcleo	regulador de la transcripción	
HOXD3	3232	206601_s_at	1,897	7	Núcleo	regulador de la transcripción	
HPS1	3257	239382_at	1,749	14	Citoplasma	otro	
HPS4	89781	--	--	14	Citoplasma	otro	
HSPA5	3309	--	--	3	Citoplasma	otro	
HUWE1	10075	214673_s_at	1,858	6	Núcleo	regulador de la transcripción	
IFNG	3458	--	--	9	Espacio extracelular	Citocina	
IFNGR1	3459	242903_at	2,171	4	Membrana plasmática	receptor transmembrana	interferón gamma-1b
IL1B	3553	--	--	4	Espacio extracelular	Citocina	Trampa de IL-1
Insulina	--	--	--	2	Desconocida	grupo	
IRS2	8660	236338_at	2,162	2	Citoplasma	otro	
ITGB3	3690	--	--	7	Membrana plasmática	receptor transmembrana	TP 9201, EMD121974, tirofiban
ITPR1	3708	--	--	4	Citoplasma	canal iónico	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
JARID1A	5927	226367_at	1,192	9	Núcleo	regulador de la transcripción	
JARID2	3720	232835_at	2,139	4	Núcleo	regulador de la transcripción	
Jnk	--	--	--	2	Desconocida	grupo	
KIAA1267	284058	224489_at	1,355	1	Núcleo	otro	
KIDINS220	57498	1557246_at	2,97	6	Núcleo	regulador de la transcripción	
KIR2DL3	3804	--	--	9	Membrana plasmática	otro	
KITLG (incluye EG:4254)	4254	--	--	9	Espacio extracelular	Factor de crecimiento	
KLF6	1316	--	--	5, 9	Núcleo	regulador de la transcripción	
LCN2	3934	--	--	9	Espacio extracelular	transportador	
LMO2	4005	--	--	9	Núcleo	otro	
LOC388135	388135	230475_at	1,979	5	Desconocida	otro	
LRRFIP1	9208	239379_at	1,796	3	Núcleo	regulador de la transcripción	
MALAT 1	378938	224568_x_at	1,699		Desconocida	otro	
Mapk	--	--	--	2	Desconocida	grupo	
MEF2C	4208	236395_at	2,104	2	Núcleo	regulador de la transcripción	
MET	4233	213816_s_at	1,283	2	Membrana plasmática	cinasa	
mGluR	--	--	--	8	Desconocida	grupo	
MIS12	79003	--	--	3	Núcleo	otro	
MLL	4297	212079_s_at	1,599	1	Núcleo	regulador de la transcripción	
MPL	4352	--	--	9	Membrana plasmática	receptor transmembrana	SB-497115

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
MTUS1	57509	239576_at	1,975	1	Desconocida	otro	
MYC	4609	--		6	Núcleo	regulador de la transcripción	
MYF6	4618	--		5	Núcleo	regulador de la transcripción	
MYO10	4651	243159_x_at	2,528	3	Citoplasma	otro	
MYOD1	4654	--		5	Núcleo	regulador de la transcripción	
N4BP2L1	90634	213375_s_at	2,01		Desconocida	otro	
Nap125		--		16	Desconocida	grupo	
NAPA	8775	239362_at	1,624	2	Citoplasma	transportador	
NAPE-PLD	222236	242635_s_at	1,216	8	Citoplasma	enzima	
NARG1	80155	1556381_at	2,827	8	Núcleo	regulador de la transcripción	
NAT13	80218	--		8	Citoplasma	enzima	
NBPF15	284565	201104_x_at	1,411	1	Desconocida	otro	
NBR1	4077	1568856_at	1,957	5	Desconocida	otro	
NCKAP1L	3071	209734_at	2,071	16	Membrana plasmática	otro	
NCOA3	8202	--		7	Núcleo	regulador de la transcripción	
NEK1	4750	213328_at	1,381	6	Núcleo	cinasa	
NES	10763	--		5	Citoplasma	otro	
NFATC2IP	84901	217527_s_at	1,272	1	Núcleo	otro	
NFKB		--		2	Desconocida	complejo	
NFKBIE (incluye EG:4794)	4794	--		13	Núcleo	regulador de la transcripción	
NMB	4828	--		8	Espacio extracelular	otro	
NPAS2	4862	1557690_x_at	1,76	7	Núcleo	regulador de la transcripción	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
NPTN	27020	228723_at	2,086	1	Membrana plasmática	otro	
NRP2	8828	210841_s_at	1,106	2, 3	Membrana plasmática	cinasa	
NUPL1	9818	241425_at	2,179	17	Núcleo	transportador	
OGG1	4968	--		9	Núcleo	enzima	
OSBPL5	114879	233734_s_at	1,261	3	Citoplasma	otro	
OSGEP	55644	242930_at	1,541	3	Desconocida	peptidasa	
MARK P38		--		2	Desconocida	grupo	
PABPN1	8106	213046_at	2,228	5	Núcleo	otro	
PAX3	5077	--		7	Núcleo	regulador de la transcripción	
PCBP1 (incluye EG:5093)	5093	--		6	Núcleo	regulador de la traducción	
PDE4B	5142	215671_at	3,457	2	Citoplasma	enzima	diprofilina, nitroglicerina, arofilina, tetomilast, L-869298, aminofilina, anagrelida, cilomilast, milrinona, rolipram, dipiridamol, L-826.141, roflumilast, tolbutamida, teofilina, pentoxifilina, cafeina
PDE5A	8654	239556_at	2,24	4	Citoplasma	enzima	diprofilina, nitroglicerina, DA-8159, aminofilina, sildenafil, dipiridamol, aspirina/dipiridamol, vardenafilo, tolbutamida, tadalafil, teofilina, pentoxifilina
PDGF BB		--		2	Desconocida	complejo	
PKD1	5163	239798_at	1,654	1	Citoplasma	cinasa	
PDSS1	23590	236298_at	1,64	15	Desconocida	enzima	
PDXDC1	23042	1560014_s_at	2,105	8	Desconocida	otro	
PHC1	1911	218338_at	1,123	5	Núcleo	otro	
PI3K		--		2	Desconocida	complejo	
PIP5K1C	23396	--		7	Membrana plasmática	cinasa	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
PIP5K3	200576	1557719_at	2,227	2	Citoplasma	cinasa	
Pka	--	--		1	Desconocida	complejo	
Pkc(s)	--	--		2	Desconocida	grupo	
PLAA	9373	--		4	Citoplasma	otro	
PLC gamma	--	--		2	Desconocida	grupo	
Pld	--	--		8	Desconocida	grupo	
PLK1	5347	--		7	Núcleo	cinasa	BI 2536
PMS2L3	5387	214473_x_at	1,159	3	Desconocida	otro	
POLR2J2	246721	1552622_s_at	1,828	1	Núcleo	regulador de la transcripción	
POU4F2	5458	--		6	Núcleo	regulador de la transcripción	
PP2A	--	--		6	Desconocida	complejo	
PRDM5	11107	--		5	Núcleo	otro	
PRKCB1	5579	--		7	Citoplasma	cinasa	enzastaurina, ruboxistaurina
progesterona	--	--		8	Desconocida	químico - endógeno de mamífero	
PSEN1	5663	242875_at	1,851	2	Membrana plasmática	peptidasa	(R)-flurbiprofeno
PTEN	5728	--		3	Citoplasma	fosfatasa	
PTK2	5747	234211_at	2,539	2	Citoplasma	cinasa	
PTPN12	5782	--		7	Citoplasma	fosfatasa	
PTPN14	5784	--		6	Citoplasma	fosfatasa	
PTPRA	5786	--		7	Membrana plasmática	fosfatasa	
PTPRD	5789	--		6	Membrana plasmática	fosfatasa	
PTPRE	5791	--		7	Membrana plasmática	fosfatasa	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
PTPRS (incluye EG:5802)	5802	1556116_s_at	1,739	7	Membrana plasmática	fosfatasa	
RAB11FIP3	9727	228613_at	2,546	8	Citoplasma	otro	
RAB11FIP4	84440	--		8	Citoplasma	otro	
Rac		--		2	Desconocida	grupo	
RAD50	10111	--		5	Núcleo	enzima	
RAD54L	8438	204558_at	1,483	5	Núcleo	enzima	
RB1	5925	--		9	Núcleo	regulador de la transcripción	
RBM25	58517	1557081_at	1,57	7	Núcleo	otro	
RBM4	5936	213718_at	1,53	7	Núcleo	otro	
RBM5	10181	209936_at	2,249	6	Núcleo	otro	
RDBP	7936	--		3	Núcleo	otro	
RHOA	387	240337_at	2,143	2	Citoplasma	enzima	
RHOBTB2	23221	1556645_s_at	1,538		Desconocida	enzima	
ARN polimerasa II		--		1	Desconocida	complejo	
RNU1A	6060	--		1	Desconocida	otro	
RP13-122B23.3	25920	1556434_at	1,985	3	Núcleo	otro	
RPL10	6134	--		6	Citoplasma	otro	
RUNX3	864	204198_s_at	1,233	7	Núcleo	regulador de la transcripción	
SBF1	6305	--		3	Membrana plasmática	fosfatasa	
SCMH1	22955	--		5	Núcleo	regulador de la transcripción	
SCN3A	6328	--		4	Membrana plasmática	canal iónico	riluzol
SEC16A	9919	--		10	Citoplasma	fosfatasa	
SEC16B	89866	1552880_at	1,877	10	Núcleo	otro	
Secretasa gamma		--		9	Desconocida	complejo	

(continuación)

Nombre	Entrez GenID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
SF1	7536	210172_at	2,452	1, 4	Núcleo	regulador de la transcripción	
SF3B1	23451	214305_s_at	1,359	1	Núcleo	otro	
SFRS15	57466	243759_at	2,028		Núcleo	otro	
SGCA	6442	1562729_at	2,395	8	Membrana plasmática	otro	
SGCB	6443	--		8	Membrana plasmática	otro	
SGCD	6444	--		8	Citoplasma	otro	
SGCG	6445	--		8	Membrana plasmática	otro	
SH2D1A (incluye EG:4068)	4068	--		5	Citoplasma	otro	
SKIL	6498	--		4	Núcleo	regulador de la transcripción	
SLC29A1	2030	--		9	Membrana plasmática	transportador	
SLC2A11	66035	232167_at	1,529	9	Membrana plasmática	otro	
SLC2A8	29988	239426_at	2,012		Membrana plasmática	transportador	
SLC30A9	10463	237051_at	2,063	7	Núcleo	transportador	
SLC4A1	6521	--		9	Membrana plasmática	transportador	
SMAD4	4089	--		6	Núcleo	regulador de la transcripción	
SMARCA5	8467	--		9	Núcleo	regulador de la transcripción	
SMC5	23137	--		12	Núcleo	otro	
SMC6	79677	218781_at	1,203	12	Núcleo	otro	
SMN1	6606	--		6	Núcleo	otro	
SNRPA1	6627	242146_at	3,54	8	Núcleo	otro	

(continuación)

Nombre	Entrez GenID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
SNW1	22938	--		5	Núcleo	regulador de la transcripción	
SON	6651	201085_s_at	1,144	5	Núcleo	otro	
SP4	6671	--		3	Núcleo	regulador de la transcripción	
esfingomielina		--		9	Desconocida	químico - endógeno de mamífero	
SPN	6693	--		3	Membrana plasmática	receptor transmembrana	
SPTBN1	6711	--		4, 6, 8	Membrana plasmática	otro	
SQLE	6713	213577_at	1,502	3	Citoplasma	enzima	
SQSTM1	8878	--		5	Citoplasma	regulador de la transcripción	
SRC	6714	--		6	Citoplasma	cinasa	dasatinib, AZM-475271
STK36	27148	231806_s_at	1,362	6	Desconocida	cinasa	
STRAP	11171	1558002_at	2,189	2	Membrana plasmática	otro	
STX3	6809	--		7	Membrana plasmática	transportador	
SUMO1	7341	--		8	Núcleo	enzima	
SUMO2	6613	--		9	Núcleo	otro	
SVIL	6840	215279_at	2,228	4	Membrana plasmática	otro	
SYNE2	23224	202761_s_at	1,356	1	Núcleo	otro	
TAF15	8148	227891_s_at	1,971	1	Núcleo	regulador de la transcripción	
TAF1A	9015	--		5	Núcleo	regulador de la transcripción	
TAF1B	9014	239046_at	1,468	5	Núcleo	regulador de la transcripción	

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
TAF1C	9013	--	5	Núcleo	regulador de la transcripción		
TAOK3	51347	22076_l_s_at	2	Citoplasma	cinasa		
Tap	--	--	17	Desconocida	complejo		
TBC1D8	11138	204526_s_at	3	Membrana plasmática	otro		
TCERG1	10915	--	8	Núcleo	regulador de la transcripción		
TCF7L2	6934	--	6	Núcleo	regulador de la transcripción		
TCOF1 (incluye EG:6949)	6949	202385_s_at	1	Núcleo	transportador		
TCR	--	--	2	Desconocida	complejo		
TERF2	7014	--	5	Núcleo	otro		
TH1L	51497	--	3	Núcleo	otro		
THAP7	80764	--	1	Núcleo	otro		
THRAP3	9967	217847_s_at	1	Núcleo	regulador de la transcripción		
TIMP1	7076	--	9	Espacio extracelular	otro		
TNF	7124	--	4	Espacio extracelular	citocina	adalimumab, etanercept, infliximab, CDP870, golimumab, talidomida	
TNRC6A	27327	234734_s_at	9	Núcleo	otro		
TP53	7157	--	5	Núcleo	regulador de la transcripción		
TP53BP1	7158	--	5	Núcleo	regulador de la transcripción		
TPM4	7171	235094_at	8	Citoplasma	otro		
Transhexapreniltransferasa	--	--	15	Desconocida	grupo		
TRIM33	51592	239716_at	6	Núcleo	regulador de la transcripción		
TRIO	7204	240773_at	2	Membrana plasmática	cinasa		

(continuación)

Nombre	Entrez GeneID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
ARNt adenililtransferasa		--		19	Desconocida	grupo	
ARNt citidililtransferasa		--		19	Desconocida	grupo	
TRNT1	51095	243236_at	2,295	19	Citoplasma	enzima	
TRPV1	7442	1556229_at	2,636	2	Membrana plasmática	canal iónico	SB-705498, capsaicina
TSG101	7251	--		5, 7	Núcleo	regulador de la transcripción	
TSPAN7	7102	--		7	Membrana plasmática	otro	
TTC3	7267	208664_s_at	1,396	7	Citoplasma	otro	
TXNL1	9352	243664_at	1,98	9	Citoplasma	enzima	
Ubiquitina		--		1	Desconocida	grupo	
UGT		--		7	Desconocida	grupo	
UGT1A6	54578	206094_x_at	3,86	7	Citoplasma	enzima	
USP36	57602	224979_s_at	1,393	18	Núcleo	peptidasa	
Vegf		--		2	Desconocida	grupo	
VEGFA	7422	--		3	Espacio extracelular	factor de crecimiento	bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib
VEGFB (incluye EG.7423)	7423	--		3	Espacio extracelular	factor de crecimiento	
VPS28	51160	--		5	Citoplasma	transportador	
VPS37B	79720	236889_at	2,85	5	Núcleo	otro	
WAS	7454	--		11	Citoplasma	otro	
WDR68	10238	233782_at	1,924	4	Citoplasma	otro	
WFS1	7466	1555270_a_at	1,315	3	Citoplasma	enzima	
WIPF2	147179	216006_at	2,916	11	Desconocida	otro	
WT1	7490	--		6	Núcleo	regulador de la transcripción	
WTAP	9589	1560274_at	1,747	2	Núcleo	otro	
XRCC5	7520	232633_at	2,106	5	Núcleo	enzima	
YWHAG	7532	--		4	Citoplasma	otro	

(continuación)

Nombre	Entrez GenID para ser humano	Affymetrix	Factor de cambio	Redes	Localización	Tipo	Fármacos
ZEB1	6935	--		5	Núcleo	regulador de la transcripción	
ZFHX3	463	215828_at	1,737	5	Núcleo	regulador de la transcripción	
ZFR	51663	238970_at	2,655		Núcleo	otro	
ZFX	7543	207920_x_at	1,625	9	Núcleo	regulador de la transcripción	
ZMYND8	23613	209049_s_at	1,102	7	Núcleo	regulador de la transcripción	
ZNF224	7767	216983_s_at	2,986	6	Núcleo	otro	
ZNF226	7769	219603_s_at	1,332	8	Núcleo	regulador de la transcripción	
ZNF326	284695	241720_at	1,418		Núcleo	regulador de la transcripción	
ZNF536	9745	233890_at	3,303		Desconocida	otro	
ZWINT (incluye EG:11130)	11130	--		3	Núcleo	otro	

Tabla 4: Genes de superficie celular

Entrez Gene ID para ser humano	Nombre	Localización
7204	TRIO	Membrana plasmática
1956	EGFR	Membrana plasmática
7102	TSPAN7	Membrana plasmática
977	CD151	Membrana plasmática
2064	ERBB2	Membrana plasmática
2321	FLT1	Membrana plasmática
2030	SLC29A1	Membrana plasmática
11171	STRAP	Membrana plasmática
8828	NRP2	Membrana plasmática
4233	MET	Membrana plasmática
273	AMPH	Membrana plasmática
351	APP	Membrana plasmática
1756	DMD	Membrana plasmática
1495	CTNNA1	Membrana plasmática
8727	CTNNAL1	Membrana plasmática
10211	FLOT1	Membrana plasmática
3459	IFNGR1	Membrana plasmática
23396	PIP5K1C	Membrana plasmática
5663	PSEN1	Membrana plasmática
6445	SGCG	Membrana plasmática
6693	SPN	Membrana plasmática
6711	SPTBN1	Membrana plasmática
6840	SVIL	Membrana plasmática
2057	EPOR	Membrana plasmática
5789	PTPRD	Membrana plasmática
4352	MPL	Membrana plasmática
5786	PTPRA	Membrana plasmática
27020	NPTN	Membrana plasmática
3690	ITGB3	Membrana plasmática
7442	TRPV1	Membrana plasmática
8639	AOC3	Membrana plasmática
1131	CHRM3	Membrana plasmática
3804	KIR2DL3	Membrana plasmática
287	ANK2	Membrana plasmática
3071	NCKAP1L	Membrana plasmática

(continuación)

Entrez Gene ID para ser humano	Nombre	Localización
5791	PTPRE	Membrana plasmática
5802	PTPRS	Membrana plasmática
6305	SBF1	Membrana plasmática
6328	SCN3A	Membrana plasmática
6442	SGCA	Membrana plasmática
6443	SGCB	Membrana plasmática
66035	SLC2A11	Membrana plasmática
29988	SLC2A8	Membrana plasmática
6521	SLC4A1	Membrana plasmática
6809	STX3	Membrana plasmática
11138	TBC1D8	Membrana plasmática

Un "gen asociado a CSC" usado en el presente documento se refiere a un gen cuya expresión o función está alterada en células madre cancerosas. Los genes asociados a CSC incluyen genes cuya expresión está significativamente alterada, p. ej., significativamente regulada positivamente o significativamente regulada negativamente, en células madre cancerosas en comparación con células madre no cancerosas, p. ej., células cancerosas que no son células madre, células normales, etc. En algunas opciones, se identifican genes que han alterado significativamente los niveles de expresión en células madre cancerosas mediante el uso de una prueba estadística adecuada para establecer la significación de diferencias entre los niveles de expresión en una célula madre cancerosa y una célula madre no cancerosa. Se conocen bien en la técnica pruebas de significación estadística y se ilustran en Applied Statistics for Engineers and Scientists de Petrucci, Chen y Nandram 1999 ed. reimpresión. La magnitud de la expresión regulada positiva o negativamente de un gen asociado a CSC en una célula madre cancerosa en comparación con una célula madre no cancerosa puede variar. En algunas opciones, el nivel de expresión de un gen asociado a CSC es de al menos 10 %, al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 250 %, al menos 500 % o al menos 1000 % mayor, o menor, que su nivel de expresión en una célula madre no cancerosa. En otras opciones, el nivel de expresión de un gen asociado a CSC es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces o más mayor, o menor, que su nivel de expresión en una célula madre no cancerosa.

Los genes asociados a CSC no se limitan a genes que están regulados positiva o negativamente en células madre cancerosas. En algunas opciones, un gen asociado a CSC es un gen que puede tener o no expresión alterada en una célula madre cancerosa, pero que, no obstante, actúa en una ruta que está desregulada en células madre cancerosas. Normalmente, las rutas desreguladas en células madre cancerosas implican el o los productos de uno o más genes cuya expresión está regulada positiva o negativamente y/o el o los productos de uno o más genes con funcionalidad alterada, p. ej., debido a una mutación, alterando de este modo la función de la ruta, p. ej., actividad excesiva o insuficiente de la ruta.

En algunas opciones, se identifican genes asociados a CSC en células madre cancerosas de un cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer renal o melanoma. En algunos casos, se identifican genes asociados a CSC en células madre cancerosas de un melanoma, que también se denominan células iniciadoras de melanoma maligno (MMIC). Otras células madre cancerosas (p. ej., CSC no ABCB5⁺) son conocidas en la técnica.

Se desvelan genes asociados a CSC ilustrativos en las tablas 1-8. En algunas opciones, un gen asociado a CSC se selecciona del grupo que consiste en: ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8.

En algunas opciones, el gen asociado a CSC es uno que no es un gen del grupo que consiste en EGFR, CD151, ERBB2, FLT1, SLC29A1, NRP2, MET, AMPH, APP, DMD e ITGB3. En algunas opciones, el gen asociado a CSC es uno que no es un gen del grupo que consiste en: TRIO, TSPAN7, STRAP, CTNNA1, CTNNA1, FLOT1, IFNGR1, PIP5K1C, PSEN1, SGCG, SPN, SPTBN1, SVIL, EPOR, PTPRD, MPL, PTPRA, NPTN, TRPV1, AOC3, CHRM3 y KIR2DL3. En algunas opciones, el gen asociado a CSC es uno que no es un gen que se haya indicado previamente como supresor tumoral u oncogén. En algunas opciones, el gen asociado a CSC es uno que no es un gen del grupo que consiste en: EWSR1, TP53, EGFR, ITPR1, NBR1, MLL, PTK2, PTPN14, RBI, JARID1A, SKIL, TNF, TP53BP1, TRIO, SF1, TAF15, NCOA3, RAD54L, CUL4A, SMARCA5, RAD50, AKAP9, DENND4A, DDX17, HECW1, ZMYND8,

ANAPC13, ANAPC5, TH1L, TRIM33 y CHD8. En algunas opciones, el gen asociado a CSC es uno que no es un gen del grupo que consiste en: BARD1, BCL2, CBS, CTNNB1, ERBB2, EWSR1, HPS1, IFNG, IL1B, PTEN, TP53, VEGFA, CHEK2 y HPS4.

5 En parte, la divulgación se refiere a genes asociados a CSC, así como a los ARN y polipéptidos (ARN y polipéptidos asociados a CSC) que codifican y a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se unen a ellos de manera específica. Los genes, ARN y polipéptidos asociados a CSC, abarcan variantes, homólogos y fragmentos. Las variantes pueden resultar de corte y empalme alternativo o variación alélica de determinados genes proporcionados en las tablas 5. En general, los homólogos y alelos compartirán normalmente al menos 90 % de identidad de nucleótidos y/o al menos 95 % de identidad de aminoácidos con las secuencias de los ácidos nucleicos y polipéptidos de antígenos de cáncer, respectivamente, en algunos casos compartirán al menos 95 % de identidad de nucleótidos y/o al menos 97 % de identidad de aminoácidos, en otros casos compartirán al menos 97 % de identidad de nucleótidos y/o al menos 98 % de identidad de aminoácidos, en otros casos compartirán al menos 99 % de identidad de nucleótidos y/o al menos 99 % de identidad de aminoácidos y en otros casos compartirán al menos 99.5 % de identidad de nucleótidos y/o al menos 99,5 % de identidad de aminoácidos. La homología se puede calcular usando diversas herramientas de software disponibles públicamente conocidas en la técnica, tales como las desarrolladas por el NCBI (Bethesda, Maryland) que están disponibles a través de Internet. Las herramientas ilustrativas incluyen el sistema BLAST (p. ej., usando los parámetros de búsqueda predeterminados de ácido nucleico (Blastn) o proteína (Blastp)) disponibles en el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) en los Institutos Nacionales de Salud.

Los genes asociados a CSC son, entre otras cosas, útiles para diagnosticar cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer renal o melanoma. Debido a que la expresión génica asociada a CSC está alterada en el cáncer (p. ej., regulada positiva o negativamente), el nivel de expresión de gen o genes asociados a CSC, p. ej., un gen enumerado en la tabla 5 o 7, en un individuo es diagnóstico de cáncer en ese individuo. En consecuencia, los métodos de diagnóstico desvelados en el presente documento pueden implicar determinar los niveles de ARN o proteína (polipéptido) asociados a CSC.

El término "individuo" como se usa en el presente documento significa cualquier individuo o sujeto mamífero, incluyendo, p. ej., seres humanos y mamíferos no humanos, tales como primates, roedores y perros. Los individuos destinados específicamente para diagnóstico y tratamiento usando los métodos descritos en el presente documento son preferentemente seres humanos.

El nivel de expresión de gen o genes asociados a CSC puede determinarse usando cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. En algunas opciones, los niveles de expresión se determinan a partir de una muestra biológica (p. ej., una muestra de prueba) obtenida de un individuo (p. ej., un ser humano). Las muestras biológicas ilustrativas incluyen una célula aislada, un tejido aislado, saliva, secreciones gingivales, líquido cefalorraquídeo, líquido gastrointestinal, moco, secreciones urogenitales, líquido sinovial, sangre, suero, plasma, orina, líquido quístico, líquido linfático, ascitis, derrame pleural, líquido intersticial, líquido intracelular, líquidos oculares, semen, secreciones mamarias, líquido vítreo y secreciones nasales. Sin embargo, las muestras biológicas no están tan limitadas y serán fácilmente evidentes para un experto en la materia otras muestras biológicas ilustrativas. Con fines de diagnóstico de melanoma, por ejemplo, la muestra biológica es preferentemente una muestra de tejido cutáneo, p. ej., una biopsia cutánea que contiene una lesión sospechosa.

Los niveles de expresión de genes asociados a CSC pueden determinarse con fines de diagnóstico usando hibridación de ácidos nucleicos o amplificación de ácidos nucleicos para detectar los ARNm que codifican. Se conocen bien en la técnica métodos para la hibridación o amplificación de ácidos nucleicos. En algunas opciones, la amplificación de ácido nucleico es RT-PCR en tiempo real o RT-PCR. Se podrían emplear otros métodos conocidos por un experto en la materia para analizar los niveles de ARNm, por ejemplo, matrices de ácidos nucleicos, análisis de ADNc, análisis de Northern y ensayos de protección de RNasa. Se pueden usar matrices de ácidos nucleicos para analizar (p. ej., con fines de diagnóstico) los niveles de expresión de múltiples genes asociados a CSC en paralelo. Otros métodos de detección de ácido nucleico adecuados serán evidentes para el experto en la materia.

Los niveles de expresión de genes asociados a CSC se pueden determinar con fines de diagnóstico mediante la detección de los polipéptidos que codifican. Se conocen bien en la técnica métodos para detectar polipéptidos. Los métodos de detección de polipéptidos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunométricos de tipo sándwich, citometría de flujo, ensayos de transferencia de Western, ensayos de inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunomicroscopía, ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral, tecnología BIACORE y métodos de proteómica, tales como espectroscopía de masas. Se pueden usar matrices de anticuerpos para analizar (p. ej., con fines de diagnóstico) los niveles de expresión de múltiples genes asociados a CSC en paralelo. Otros métodos de detección de polipéptidos adecuados serán evidentes para el experto en la materia.

En algunas opciones, p. ej., cuando se usen matrices de polipéptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos, se pueden analizar los niveles de expresión de hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54,

55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399 o más genes asociados a CSC en paralelo.

Los métodos de diagnóstico de la divulgación implican una comparación entre los niveles de expresión de genes asociados a CSC en una muestra de prueba y un valor de referencia. Los resultados de la comparación son diagnósticos de cáncer, p. ej., melanoma. En algunas opciones, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen en una muestra de referencia. Un valor de referencia puede ser un valor predeterminado y también se puede determinar a partir de muestras de referencia (p. ej., muestras biológicas de control) probadas en paralelo con las muestras de prueba. Un valor de referencia puede ser un nivel de control positivo o negativo. Un valor de referencia puede ser un único valor de corte, tal como una mediana o media o un intervalo de valores, tal como un intervalo de confianza. Se pueden establecer valores de referencia para diversos subgrupos de individuos, tales como individuos predispuestos al cáncer, individuos que tienen cáncer en estadio temprano o tardío, individuos masculinos y/o femeninos o individuos que se someten a terapia contra el cáncer. El nivel del valor de referencia dependerá de la población o el subgrupo particular seleccionado. Por ejemplo, una población aparentemente sana tendrá un valor "normal" diferente al que tendrá una población que tenga cáncer o una población que tenga predisposición al cáncer. Se pueden seleccionar intervalos y categorías adecuados para los valores de referencia sin nada más que experimentación rutinaria por parte de los expertos en la materia.

La muestra de referencia puede ser cualquiera de diversas muestras biológicas contra las que se puede realizar una evaluación de diagnóstico. Los ejemplos de muestras de referencia incluyen muestras biológicas de poblaciones de control o muestras de control. Pueden generarse muestras de referencia a través de la fabricación para su suministro para pruebas en paralelo con las muestras de prueba, p. ej., la muestra de referencia puede suministrarse en equipos de diagnóstico. Cuando la muestra de referencia es de un cáncer, p. ej., tejido tumoral, el nivel de expresión de la muestra de referencia (el valor de referencia) es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en el cáncer. De manera similar, cuando la muestra de referencia es una muestra normal, p. ej., tejido no tumoral, el nivel de expresión de la muestra de referencia (el valor de referencia) es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en el tejido no tumoral. De manera similar, cuando la muestra de referencia es una muestra de células madre cancerosas, el nivel de expresión de la muestra de referencia (el valor de referencia) es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de células madre cancerosas. En algunas opciones, la muestra de referencia es de un melanoma y el nivel de expresión de la muestra de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en melanoma. En algunas opciones, la muestra de referencia es de un tejido distinto de melanoma y el nivel de expresión de la muestra de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en tejido distinto de melanoma. Otras muestras de referencia adecuadas serán evidentes para el experto en la materia.

Los métodos de diagnóstico se basan en parte en una comparación de los niveles de expresión de genes asociados a CSC entre las muestras de prueba y la muestra de referencia. En algunas opciones, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es aproximadamente igual al nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia, entonces la muestra de prueba y la muestra de referencia probablemente tengan un origen, categoría o clase similar. Por ejemplo, si los niveles de expresión en una muestra de prueba y una muestra de referencia son aproximadamente iguales (p. ej., no son estadísticamente significativamente diferentes) y la muestra de referencia es de un tejido normal, entonces la muestra de prueba es probablemente una muestra tisular normal y se podría indicar un diagnóstico normal. Como alternativa, si los niveles de expresión en una muestra de prueba y una muestra de referencia son aproximadamente iguales y la muestra de referencia es de un tejido canceroso, entonces la muestra de prueba es probablemente una muestra de cáncer y se podría indicar un diagnóstico de cáncer. En determinadas opciones, si el nivel de expresión en una muestra de prueba y una muestra de referencia son aproximadamente iguales y la muestra de referencia es de un melanoma, entonces la muestra de prueba es probablemente una muestra de melanoma y se podría indicar un diagnóstico de melanoma.

En algunos casos, dependiendo de factores tales como los genes asociados a CSC particulares que se evalúen, la afección que se diagnostique y el tipo de muestra de referencia, un nivel de expresión de un gen asociado a CSC en una muestra de prueba que es estadísticamente significativamente mayor o estadísticamente significativamente menor que su nivel de expresión en una muestra de referencia indica un diagnóstico. Por ejemplo, cuando el gen asociado a CSC se encuentra entre los enumerados en la tabla 1 u 8 y el valor de referencia es el nivel de expresión

del gen asociado a CSC en una muestra de referencia normal (p. ej., no cancerosa), si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es significativamente mayor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra normal de referencia, la comparación indica cáncer, p. ej., melanoma. De manera similar, cuando el gen asociado a CSC se encuentra entre los enumerados en la tabla 1 u 8 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia de cáncer, p. ej., melanoma, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es significativamente menor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia de cáncer, la comparación no indica cáncer. Como alternativa, cuando el gen asociado a CSC se encuentra entre los enumerados en la tabla 2 o 7 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia normal, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es significativamente menor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia normal, la comparación indica cáncer. De manera similar, cuando el gen asociado a CSC se encuentra en la tabla 2 o 7 y el valor de referencia es el nivel de expresión del gen asociado a CSC en una muestra de referencia de cáncer, p. ej., melanoma, si el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es significativamente mayor que el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de referencia de cáncer, la comparación no indica melanoma. Los expertos en la técnica pueden seleccionar combinaciones adecuadas de gen o genes asociados a CSC particulares, afecciones para diagnosticar y tipos de muestras de referencia, sin nada más que experimentación rutinaria para su uso en los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento.

La magnitud de la diferencia entre la muestra de prueba y la muestra de referencia que es suficiente para indicar un diagnóstico dependerá de diversos factores, tales como el gen o los genes asociados a CSC particulares que se evalúen, la condición que se diagnostique, la heterogeneidad en poblaciones sanas o enfermas de las que se extraen muestras, el tipo de muestra de referencia, la magnitud del nivel de expresión de un gen asociado a CSC, el ensayo que se use, etc. Está dentro del alcance del experto en la materia determinar la magnitud adecuada de diferencia entre la muestra de prueba y la muestra de referencia que es suficiente para indicar un diagnóstico. En algunas opciones, el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 % o más por encima del nivel de expresión del gen en la muestra de referencia. En otras opciones, el nivel de expresión del gen asociado a CSC en la muestra de prueba es de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 % o más por debajo del nivel de expresión del gen en la muestra de referencia.

Algunos genes asociados a CSC que normalmente se producen en cantidades muy bajas pero cuya producción aumenta drásticamente en células tumorales, p. ej., un gen asociado a CSC en la tabla 1 u 8, pueden desencadenar una respuesta inmunitaria. Por tanto, en algunos casos, la inmunorreactividad específica contra un polipéptido asociado a CSC, p. ej., un polipéptido codificado por un gen enumerado en la tabla 1 u 8, en un individuo puede ser diagnóstico de cáncer en el individuo. La inmunorreactividad contra polipéptidos asociados a CSC puede ser humoral o celular y está asociada con una respuesta inmunitaria específica a un polipéptido asociado a CSC que está regulado positivamente en una célula madre cancerosa en un individuo. En el caso de una respuesta humoral, los métodos de diagnóstico pueden implicar la detección de la presencia de uno o más anticuerpos en un individuo que se unen específicamente a polipéptidos asociados a CSC. Se desvelan en el presente documento métodos para detectar anticuerpos (p. ej., ELISA, matrices de péptidos, etc.) y son bien conocidos en la técnica. En algunos casos, la presencia de células efectoras específicas de polipéptido de CSC es diagnóstico de una respuesta inmunitaria específica para ese polipéptido de CSC.

Los linfocitos T reconocen complejos de ligandos peptídicos (p. ej., polipéptidos asociados a CSC) y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentados en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Los tetrámeros de clase I se unen con un conjunto definido de receptores de linfocitos T (TCR) en un subconjunto de linfocitos T CD8+ y los tetrámeros de clase II se unen con una población definida de linfocitos T CD4+. Se conocen bien en la técnica métodos para detectar linfocitos T específicos de antígeno usando tetrámeros del MHC (p. ej., New Microarray Detects Antigen-Specific T Cells and Immune Responses. PLoS Biol 1 (3): e76 2003) y pueden usarse para detectar linfocitos T específicos del polipéptido de CSC que pueden ser diagnósticos de cáncer en un individuo. Los reactivos ITAG, por ejemplo, de Beckman Coulter proporcionan una manera conveniente de medir la respuesta celular dirigida hacia un único péptido asociado a CSC usando tetrámeros del MHC.

Los métodos para evaluar la expresión de genes asociados a CSC, p. ej., métodos de diagnóstico, desvelados en el presente documento puede combinarse con métodos para tratar a un individuo que tiene o se sospecha que tiene cáncer. El tratamiento puede comprender una etapa para determinar el nivel de expresión del gen asociado a CSC en el individuo. El tratamiento también puede comprender una etapa de comparar el nivel de expresión del gen asociado a CSC con un valor de referencia, de modo que los resultados de la comparación son diagnósticos de cáncer en el individuo. En determinados casos, si la comparación da lugar a un diagnóstico de cáncer en el individuo, se realiza la etapa de administración. En algunos casos, después de realizar un diagnóstico usando los métodos desvelados en el presente documento, se selecciona un plan de tratamiento. Por ejemplo, si un ensayo de diagnóstico revela que la expresión de un gen asociado a CSC en particular está alterada, p. ej., aumentada o disminuida, en comparación con una muestra de referencia normal, entonces se puede implementar un tratamiento dirigido a ese gen asociado a CSC en particular. Los métodos de diagnóstico también se pueden usar para evaluar

la respuesta a un tratamiento. Por ejemplo, la determinación y la comparación se pueden repetir en uno o más intervalos después de la etapa de administración para evaluar la respuesta al tratamiento.

5 Pueden construirse matrices de polipéptidos asociados a CSC y las matrices de anticuerpos que se unen a polipéptidos asociados a CSC inmovilizando grandes cantidades de polipéptidos asociados a CSC aislados o anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, en un soporte sólido. Se conocen bien en la técnica métodos para producir matrices de polipéptidos y anticuerpos. Los métodos normalmente implican la producción de proteínas (polipéptidos o anticuerpos asociados a CSC) a partir de una biblioteca de expresión, clonada en células de *E. coli*, levadura o mamífero, o sistema similar, p. ej., hibridomas etc., a partir de las que, a continuación, las proteínas expresadas se purifican, por ejemplo, a través de His, marcador de GST o purificación por afinidad de proteína A/G. La transcripción/traducción de proteínas sin células es una alternativa para la síntesis de proteínas que no se expresan bien en sistemas bacterianos u otros *in vivo*. Los polipéptidos o anticuerpos asociados a CSC aislados purificados se inmovilizan en la superficie de la matriz (superficie de soporte sólido) usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas se pueden inmovilizar mediante adsorción, interacciones covalentes (p. ej., aldehídos) y no covalentes (p. ej., biotina-estreptavidina). Otros métodos de conjugación serán fácilmente evidentes para un experto en la materia. En algunas opciones, las matrices de polipéptidos de la divulgación consisten esencialmente en al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100 o más polipéptidos o fragmentos inmunogénicos de los mismos codificados por genes asociados a CSC expuestos en la tabla 1, 5, 7 u 8. En algunas opciones, las matrices de anticuerpos de la divulgación consisten esencialmente en al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100 o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno diferentes que se unen específicamente a polipéptidos (polipéptidos asociados a CSC) codificados por un gen asociado a CSC expuestos en la tabla 1, 5, 7 u 8.

25 Se conocen bien en la técnica métodos para producir matrices de ácidos nucleicos. Se pueden construir matrices de ácidos nucleicos, p. ej., inmovilizando en un soporte sólido grandes cantidades de oligonucleótidos, polinucleótidos o ADNc que tienen secuencias complementarias de ARNm asociados a CSC. También se remite al experto en la materia al capítulo 22 "Nucleic Acid Arrays" de Current Protocols In Molecular Biology (Eds. Ausubel *et al.* John Wiley y n.º 38; Sons NY, 2000), publicación internacional WO00/58516, patente de los Estados Unidos n.º 5.677.195 y patente de los Estados Unidos n.º 5.445.934 que proporcionan métodos ilustrativos relacionados con la construcción y el uso de matrices de ácidos nucleicos en la detección de ácidos nucleicos de interés. En algunas opciones, las matrices de ácidos nucleicos consisten esencialmente en al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300 o más de los genes asociados a CSC expuestos en la tabla 1, 5, 7 u 8.

35 En algunas opciones, los niveles de expresión de múltiples genes asociados a CSC se pueden combinar para producir un perfil de expresión. Como se usa en el presente documento, el "perfil de expresión" se refiere a un conjunto de niveles de expresión de múltiples (p. ej., 2 o más) genes asociados a CSC. Los perfiles de expresión tienen diversos usos. Por ejemplo, los perfiles de expresión se pueden usar para clasificar (o subclasificar) una muestra, preferentemente una muestra clínica. En algunas opciones, se usan muestras de referencia, para las que ya se ha determinado una clasificación, p. ej., una categoría de enfermedad, p. ej., cáncer de mama, cáncer de próstata, melanoma, etc., para producir perfiles de expresión conocidos. En algunas opciones, la similitud de un perfil de expresión de una muestra de prueba y un perfil de expresión conocido se evalúa comparando el nivel del mismo gen asociado a CSC en la prueba y los perfiles de expresión conocidos (es decir, pares de niveles de expresión). En algunos casos, un perfil de expresión de prueba se compara con uno o más miembros de múltiples perfiles de expresión conocidos y se identifica un perfil de expresión conocido que se asemeja más estrechamente (es decir, es más similar) al perfil de prueba. En determinados casos, la clasificación de un perfil de expresión conocido que se identifica como similar a un perfil de expresión de prueba se asigna al perfil de expresión de prueba, clasificando de este modo la muestra clínica asociada con el perfil de expresión de prueba. Los métodos son útiles para clasificar muestras en una gama de fenotipos, p. ej., estado de la enfermedad, estado de riesgo, etc., en función de los perfiles de expresión. En algunas opciones, puede construirse un modelo de clasificación (p. ej., función discriminante, bayesiano simple, máquina de vectores de apoyo, regresión logarítmica y otros conocidos en la técnica) basado en los perfiles de expresión de referencia de diversas muestras de individuos que se sabe que tienen diferentes trastornos (p. ej., cánceres) y/o de individuos sanos, y usarse para clasificar muestras obtenidas posteriormente (p. ej., muestras clínicas).

55 La divulgación también proporciona métodos para estratificar una población que comprende individuos que tienen cáncer. En algunas opciones, los métodos implican determinar los niveles de expresión de al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300 o más de los genes asociados a CSC expuestos en la tabla 5, 7 u 8, por ejemplo, mediante el uso de las matrices de la divulgación, y estratificar la población en función de los niveles de expresión. Los métodos de estratificación son útiles en estudios epidemiológicos, por ejemplo, para identificar subpoblaciones de individuos con riesgo de cáncer. Los métodos también son útiles en estudios clínicos para identificar subpoblaciones de pacientes que responden mejor o peor a un tratamiento en particular.

65 En algunos aspectos, los genes asociados a CSC proporcionan una base para identificar, aislar, clonar, propagar y expandir las poblaciones de CSC *in vitro*. La presente divulgación contempla cualquier método adecuado para

emplear agentes, p. ej., péptidos aislados, p. ej., anticuerpos, que se unen con polipéptidos asociados a CSC para separar las CSC de otras células. En consecuencia, se incluye en la presente divulgación un método para producir una población de CSC aisladas. Los métodos implican poner en contacto una muestra, p. ej., una suspensión celular, con uno o una combinación de agentes, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o ligandos, que reconocen y se unen con un epítipo, p. ej., una proteína de la superficie celular, incluyendo polipéptidos asociados a CSC (p. ej., polipéptidos codificados por los genes enumerados en la tabla 4), en las CSC y separar y recuperar de la muestra las células con las que se unen los agentes. El polipéptido asociado a CSC puede estar codificado por un gen asociado a CSC que se selecciona del grupo que consiste en: ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8.

En algunos casos, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos disponibles en el mercado que se unen a polipéptidos asociados a CSC pueden usarse en los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos contra ANK2 incluyen, p. ej., anticuerpo policlonal de conejo antianquirina humana de cerebro de Abcam; clon 2.2 de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ANK2 humano de Genway Biotech, Inc.; y monoclonal de ratón antianquirina humana, variante de cerebro 2 (ANK2), clon 2.20 y policlonal de conejo antianquirina humana, variante de cerebro 2 (ank2) de Lifespan Biosciences. Los anticuerpos contra NCKAP1L incluyen, p. ej., anticuerpo policlonal de conejo anti-HEM1 humano de Proteintech Group, Inc. y se describen en Weiner OD, *et al.*, (2006) Hem-1 Complexes Are Essential for Rac Activation, Actin Polymerization, and Myosin Regulation during Neutrophil Chemotaxis. PLoS Biol 4 (2): e38. Los anticuerpos contra PTPRE incluyen, p. ej., anticuerpo policlonal de conejo anti-PTP épsilon C-term RB0551-0552 de Abgent, anticuerpo policlonal de ratón anti-PTPRE humano de Abnova Corporation; anticuerpo monoclonal de ratón anti-PTPRE clon 2D10 de Abnova Corporation; anticuerpo policlonal de pollo anti-PTPRE humano de Thermo Scientific; y anticuerpo de conejo anti-proteína tirosina fosfatasa épsilon (PTPRE) de Acris Antibodies GmbH. Los anticuerpos contra PTPRS incluyen, p. ej., anticuerpo monoclonal de ratón anti-PTPRS de Abcam; anticuerpo monoclonal de ratón anti-PTPRS humano clon 1H6 de Abnova Corporation; anticuerpo policlonal de pollo anti-PTPRS humano de ABR-Affinity Bioreagents, comercializado ahora como Thermo Scientific; anticuerpo policlonal de pollo anti-PTPRS humano de GeneTex; y anticuerpo monoclonal de ratón anti-PTPRS humano, clon 1H6 de GeneTex. Los anticuerpos contra SCN3A incluyen, p. ej., anticuerpo policlonal de conejo anti-SCN3A de Abcam; anticuerpo monoclonal de ratón anti-SCN3A humano clon 3F3 de Abnova Corporation; y anticuerpo monoclonal de ratón anti-SCN3A humano clon 3F3 de GeneTex. Los anticuerpos contra SCNB incluyen, p. ej., anticuerpo monoclonal de ratón anti-sarcoglucano beta de Abcam; anticuerpo monoclonal de ratón anti-SGCB humano clon 1C10 de Abnova Corporation; anticuerpo monoclonal de ratón anti-SGCB humano clon 1C10 de GeneTex; y policlonal de conejo anti-beta-sarcoglucano humano (SGCB) de Lifespan Biosciences. Los anticuerpos contra SLC2A8 incluyen, p. ej., anticuerpo policlonal de conejo anti-transportador de glucosa 8 humano de Abcam; anticuerpo policlonal de cabra anti-GLUT8/SLC2A8 de Everest Biotech; anticuerpo policlonal de conejo anti-transportador de glucosa 8 GenWay Biotech, Inc.; anticuerpo policlonal de conejo anti-transportador de glucosa 5 humano, extremo C de GenWay Biotech, Inc.; anticuerpo policlonal de cabra anti-SLC2A8 de IMGENEX; y policlonal de conejo anti-miembro 8 de la familia del vehículo de soluto humano 2 (transportador de glucosa facilitado) (Slc2a8) de Lifespan Biosciences. Los anticuerpos contra SBF1 incluyen, p. ej., anticuerpo policlonal de conejo anti-MTMR5 C-term RB0717 de Abgent. Los anticuerpos contra SGCA incluyen, p. ej., anticuerpo monoclonal de ratón anti-SGCA clon 3C4 de Abnova Corporation; anticuerpo policlonal de conejo anti-SGCA humano de Atlas Antibodies; anticuerpo monoclonal de ratón anti-SGCA clon 3C4 de Novus Biologicals; PRESTIGE ANTIBODIES de conejo anti-SGCA humano de Sigma-Aldrich. Los anticuerpos contra SLC2A11 incluyen, p. ej., policlonal de conejo anti-miembro 11 de la familia del vehículo de soluto humano 2 (transportador de glucosa facilitado) (Slc2a11) de Lifespan Biosciences. Los anticuerpos contra SLC4A1 incluyen, p. ej., anticuerpo policlonal de conejo anti-Band 3 humano, extremo N de Abcam; anticuerpo policlonal de ratón anti-SLC4A1 humano MaxPab® de Abnova Corporation; anticuerpo policlonal de conejo anti-SLC4A1 humano de Aviva Systems Biology; anticuerpo monoclonal de ratón anti-Band 3 clon Bill 136 de GenWay Biotech, Inc.; y monoclonal de ratón anti-intercambiador aniónico, miembro 1 de la familia del vehículo de soluto humano 4, (SLC4A1) clon 3h3 de Lifespan Biosciences. Los anticuerpos contra STX3 incluyen, p. ej., anticuerpo policlonal de conejo anti-STX3 humano de Atlas Antibodies y de conejo anti-STX3 humano de Sigma-Aldrich. Los anticuerpos contra TBC1D8 incluyen, p. ej., anticuerpo monoclonal de ratón anti-TBC1D8 humano clon 1A12 de Abnova Corporation; anticuerpo monoclonal de ratón anti-TBC1D8 humano clon 1A12 de GeneTex; anticuerpo monoclonal de ratón anti-TBC1D8 humano clon SS-18 de Santa Cruz Biotechnology, Inc.; y anticuerpo policlonal de conejo anti-TBC1D8 humano, aa 132-231 de Strategic Diagnostics, Inc.

Los agentes pueden ligarse a una fase sólida y utilizarse para capturar CSC de una muestra. Las células unidas se pueden separar después de la fase sólida mediante métodos conocidos dependiendo de la naturaleza del agente, p. ej., anticuerpo y fase sólida. Como alternativa, los agentes se pueden conjugar con un marcador detectable, p. ej., un fluoróforo, que pueden utilizarse para separar células en una fase líquida, tal como mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Se conocen bien en la técnica fluoróforos ilustrativos (p. ej., las tecnologías de MOLECULAR PROBES de Invitrogen) e incluyen FITC, TRITC, Cy3, Cy5, colorantes fluorescentes Alexa y puntos cuánticos.

Los sistemas adecuados para preparar la población celular deseada incluyen una columna de perlas magnéticas/partículas paramagnéticas que utiliza péptidos aislados que se unen a polipéptidos asociados a CSC para selección positiva o negativa; separación basada en afinidad por biotina o estreptavidina; y clasificación por

citometría de flujo a alta velocidad de CSC teñidas con inmunofluorescencia mezcladas en una suspensión de otras células. Por tanto, los métodos de la presente divulgación incluyen el aislamiento de una población de CSC.

Las CSC aisladas se pueden preparar como preparaciones sustancialmente puras. La expresión "sustancialmente pura" significa que una preparación carece sustancialmente de otras células. Por ejemplo, una CSC aislada debería constituir al menos 70 por ciento de las células totales presentes prefiriéndose porcentajes mayores, p. ej., al menos 85, 90, 95 o 99 por ciento. Las células se pueden empaquetar en un recipiente terminado, al como un criovial, junto con cualquier otro componente que pueda desearse, p. ej., agentes para conservar las células o reducir el crecimiento bacteriano. Las CSC son útiles para diversos fines. Las células aisladas se pueden usar en entornos de investigación básica y en ensayos de exploración para identificar compuestos o composiciones que afectan al crecimiento de CSC.

Las CSC aisladas, preparadas según los métodos desvelados en el presente documento, pueden ser útiles en un contexto de descubrimiento de fármacos para la identificación y optimización de compuestos candidatos en exploraciones basadas en células. Por ejemplo, el efecto de un compuesto sobre el crecimiento y/o la supervivencia de una CSC se puede determinar en una exploración basada en células que usa un ensayo seleccionado entre: un ensayo de recuento celular, un ensayo de marcaje de replicación, un ensayo de integridad de la membrana celular, un ensayo de viabilidad celular basado en ATP, un ensayo de actividad reductasa mitocondrial, un ensayo de actividad caspasa, un ensayo de tinción con anexina V, un ensayo de contenido de ADN, un ensayo de degradación del ADN y un ensayo de fragmentación nuclear. Otros ensayos ilustrativos incluyen BrdU, EdU o ensayos de incorporación de timidina-H3; Ensayos de contenido de ADN usando un colorante de ácido nucleico, tal como colorante Hoechst, DAPI, actinomicina D, 7-aminoactinomicina D o yoduro de propidio; ensayos de metabolismo celular tales como AlamarBlue, MTT, XTT y CellTitre Glo; ensayos de fragmentación nuclear; ensayo de fragmentación de ADN asociado a histonas citoplasmáticas; ensayo de escisión de PARP; tinción de TUNEL; y tinción de anexina.

En algunos aspectos, los agentes para aislar CSC son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la divulgación incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, F(ab')₂, Fab, Fd, Fv o fragmentos Fv de cadena sencilla.

Otros aspectos de la divulgación se refieren a métodos de tratamiento. En algunas opciones, los métodos implican la modulación, p. ej., inducción o inhibición, de la actividad de los genes asociados a CSC (ARN o proteína) y, de este modo, inhibición del crecimiento y la supervivencia de las células madre cancerosas. En algunas opciones, los métodos de tratamiento implican la administración selectiva, p. ej., mediante anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, de agentes terapéuticos a las células madre cancerosas. Los métodos son útiles para inhibir la proliferación y/o supervivencia de las células madre cancerosas y, por lo tanto, son útiles para tratar el cáncer, p. ej., melanoma. El nivel de modulación, p. ej., inducción o inhibición, de la actividad de un gen asociado a CSC que es suficiente para afectar al crecimiento y/o la supervivencia de una célula madre cancerosa en comparación con un nivel de control depende de diversos factores, incluyendo el gen particular asociado a CSC que se module, la célula madre cancerosa dentro de la que se produce la modulación y el nivel de expresión en la muestra de control. Está dentro del alcance del experto en la materia determinar el nivel adecuado de modulación que sea suficiente para inhibir el crecimiento y/o la supervivencia de una célula madre cancerosa.

El término "inhibir" se refiere a cualquier disminución del nivel de expresión o actividad. Como se usa en el presente documento, "inhibir", "suprimir" o "reducir" pueden ser completos o no. Por ejemplo, la proliferación celular, puede disminuirse o no a un estado de detención completa para que un efecto sea considerado de supresión, inhibición o reducción de la proliferación celular. Por otra parte, "suprimir", "inhibir" o "reducir" puede comprender el mantenimiento de un estado existente y el proceso de efectuar un cambio de estado. Por ejemplo, la inhibición de la proliferación celular puede referirse a la prevención de la proliferación de una célula no proliferativa (mantenimiento de un estado no proliferativo) y al proceso de inhibición de la proliferación de una célula proliferativa (proceso de efectuar un cambio del estado de proliferación). De manera similar, la inhibición de la supervivencia celular puede referirse a la destrucción de una célula, o células, tal como por necrosis o apoptosis, y el proceso de hacer a una célula susceptible a la muerte, tal como por inhibición de la expresión o actividad de un factor regulador antiapoptótico. La supresión, inhibición o reducción puede ser al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % del nivel de control (p. ej., Un estado sin tratar). En algunos casos, el nivel de modulación (p. ej., supresión, inhibición o reducción) en comparación con un nivel de control es estadísticamente significativo. "Estadísticamente significativo" es un término bien conocido en la técnica y, por ejemplo, puede referirse a un valor de p de menos de 0,05, p. ej., un valor de p inferior a 0,025 o un valor de p inferior a 0,01, usando una prueba estadística adecuada (p. ej., ANOVA, MANOVA, prueba de la t, prueba de comparación múltiple, etc.).

Los métodos implican tratar a un individuo que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer. Como se usa en el presente documento, un "individuo en riesgo de tener cáncer" es un individuo, p. ej., un ser humano, con una mayor probabilidad de tener cáncer en comparación con una población de control, p. ej., una población general. Se puede evaluar uno cualquiera de varios factores de riesgo conocidos en la técnica para determinar si un individuo está o no

en riesgo de tener cáncer. Por ejemplo, los factores que hacen que un individuo esté en riesgo de tener melanoma incluyen, por ejemplo, exposición a rayos UV, antecedentes familiares de melanoma, antecedentes personales de melanoma, piel blanca, pecas, altas cantidades de nevos (lunares), cabello claro, edad, sexo y xerodermia pigmentosa.

Los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento pueden implicar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que induce la expresión de un gen asociado a CSC que está regulado negativamente en el cáncer (p. ej., un gen en la tabla 2 o 7). En algunos casos, la composición que induce la expresión de un gen asociado a CSC comprende un vector, tal como un plásmido aislado, que expresa el gen asociado a CSC.

Como se usa en el presente documento, un "vector" puede ser cualquiera de varias moléculas de ácido nucleico en las que puede insertarse una secuencia deseada mediante restricción y ligamiento para transporte entre diferentes ambientes genéticos o para expresión en una célula hospedadora. Los vectores están compuestos normalmente de ADN aunque también están disponibles vectores de ARN. Los vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagémidos y genomas de virus o partes de los mismos.

Un vector de expresión es uno en el que se puede insertar una secuencia deseada, p. ej., mediante restricción y ligamiento de modo que se una operativamente con secuencias reguladoras y se pueda 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 se han transformado o transfectado con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o reducen la resistencia o sensibilidad a antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica (p. ej., β -galactosidasa o fosfatasa alcalina) y genes que afectan visiblemente al fenotipo de células transformadas o transfectadas, hospedadores, colonias o placas (p. ej., proteína verde fluorescente).

Son rutinarios en la técnica métodos para identificar y obtener secuencias codificantes para su uso en los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, el experto en la materia puede buscar en la base de datos Entrez Gene usando un GeneID o GeneAlias de un gen asociado a CSC, p. ej., un GeneID enumerado en la tabla 5, 7 u 8, para identificar transcritos asociados con genes asociados a CSC. En la mayoría de los casos, se proporcionan enlaces a proveedores comerciales (p. ej., Open Biosystems) de ADNc que contienen los transcritos en la interfaz web de Entrez Gene, que se pueden utilizar para obtener una copia del clon de ADNc. En otros casos, pueden contactarse directamente con fuentes comerciales (p. ej., Sigma Aldrich).

Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia codificante y las secuencias reguladoras están unidas "operativamente" cuando se unen de manera covalente de modo 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 unidas operativamente 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 no (1) da como resultado la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de las secuencias codificantes o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente para traducirse en una proteína. Por tanto, una región promotora estaría unida operativamente a una secuencia codificante si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de modo que el transcrito resultante pudiera traducirse en la proteína o el polipéptido deseados. Se apreciará que no es necesario que una secuencia codificante codifique una proteína, sino que puede en su lugar, por ejemplo, codificar un ARN funcional tal como un ARNhc.

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos celulares, pero deberá incluir, en general, según sea necesario, secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como una secuencia TATA, secuencia de caperuza, secuencia de CAAT y similares. Dichas secuencias reguladoras 5' no transcritas incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control de la transcripción del gen unido operativamente. Las secuencias reguladoras pueden incluir también secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en dirección 5' según se desee. Los vectores de la divulgación pueden incluir opcionalmente secuencias líderes o señal 5'. La elección y el diseño de un vector adecuado están dentro la capacidad y el criterio de un experto habitual en la materia. Un experto en la materia conocerá secuencias reguladoras adecuadas para la expresión de ARN de interferencia, p. ej., ARNhc, miARN, etc.

En algunas opciones, un vector de virus para administrar una molécula de ácido nucleico, un plásmido aislado, se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, poxvirus, incluyendo virus vaccinia y poxvirus atenuados, virus del bosque de Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana, retrovirus, virus Sindbis y partículas de tipo virus Ty. Los ejemplos de virus y partículas de tipo vírico que se han usado para administrar ácidos nucleicos exógenos incluyen: adenovirus defectuosos en replicación (p. ej., Xiang *et al.*, *Virology* 219: 220-227, 1996; Eloit *et al.*, *J. Virol.* 7: 5375-5381, 1997; Chengalvala *et al.*, *Vaccine* 15: 335-339, 1997), un retrovirus modificado (Townsend *et al.*, *J. Virol.* 71: 3365-3374, 1997), un retrovirus no replicante (Irwin *et al.*, *J. Virol.* 68: 5036-

5044, 1994), un virus del bosque de Semliki defectuoso en replicación (Zhao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3009-3013, 1995), virus de la viruela del canario y un derivado de virus vaccinia muy atenuado (Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11349-11353, 1996), virus vaccinia no replicativo (Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11341-11348, 1996), virus vaccinia replicativo (Moss, Dev. Biol. Stand. 82: 55-63, 1994), virus de la encefalitis equina venezolana (Davis *et al.*, J. Virol. 70: 3781-3787, 1996), virus Sindbis (Pugachev *et al.*, Virology 212: 587-594, 1995), vectores lentivíricos (Naldini L, *et al.*, Proc Natl Acad Sci US A. 15 oct 1996; 93 (21): 11382-8) y partícula de tipo virus Ty (Allsopp *et al.*, Eur. J. Immunol 26: 1951-1959, 1996).

Otro virus útil para determinadas aplicaciones es el virus adenoasociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adenoasociado es capaz de infectar una amplia gama de tipos celulares y especies y puede modificarse mediante ingeniería genética para que sea deficiente en replicación. Tiene ventajas adicionales, tales como estabilidad térmica y frente a disolvente lipídico, altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas, y falta de inhibición de la sobreinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. El virus adenoasociado puede integrarse en el ADN celular humano de una manera específica de sitio, minimizando de este modo la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la expresión de los genes insertados. Además, se han seguido infecciones por virus adenoasociados de tipo silvestre en cultivo tisular durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede actuar de manera extracromosómica.

Otros vectores víricos útiles se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que los genes no esenciales se han reemplazado con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen determinados retrovirus, cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa de ARN vírico genómico en ADN con la posterior integración provírica en el ADN celular del hospedador. En general, los retrovirus son deficientes en replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de los transcritos deseados, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovírica genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Se proporcionan protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula de empaquetamiento revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recogida de partículas víricas de los medios de cultivo de tejidos e infección de las células diana con partículas víricas) en Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual," W.H. Freeman Co., Nueva York (1990) y Murry, E.J. Ed. "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, Nueva Jersey (1991).

En algunas opciones, los vectores plasmídicos aislados comprenden un promotor específico de tumor, p. ej., específico de melanoma, p. ej., de tirosinasa, unido operativamente con el gen asociado a CSC (véase, p. ej., Lillehammer, T. *et al.*, Cancer Gene Therapy (2005) 12, 864-872). Otros promotores específicos de tumor ilustrativos son conocidos en la técnica y resultarán evidentes para el experto en la materia.

Los métodos de tratamiento pueden implicar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que se dirige a un producto de un gen asociado a CSC (es decir, tabla 1), que son genes asociados a CSC que se regulan positivamente en células madre cancerosas. La composición puede dirigirse a un producto de un gen asociado a CSC seleccionado del grupo expuesto en la tabla 4, que están regulados positivamente en células madre cancerosas y están asociados con la superficie celular.

Puede actuarse sobre el producto, p. ej., ARNm o proteína, de un gen asociado a CSC mediante uno cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la composición puede comprender un reactivo de atenuación génica, p. ej., ARNip, que es complementario de un ARNm asociado a CSC e inhibe su expresión. En otras opciones, la composición puede comprender una molécula aislada, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, que se conjuga con un ARNip y que se une específicamente con un polipéptido asociado a CSC. Dichos ARNip conjugados con anticuerpos (o agentes de supresión génica similares) pueden dirigirse a un ARNm asociado a CSC tal como cualquiera de los codificados por los genes expuestos en la tabla 1.

El gen asociado a CSC puede seleccionarse del siguiente grupo ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8, que están regulados positivamente en células madre cancerosas y están asociados con la superficie celular. El ARNip puede dirigirse a otro gen en la célula que es útil para inhibir el crecimiento y/o supervivencia de la célula, por ejemplo, un oncogén. Por ejemplo, los oncogenes que pueden ser diana incluyen FOS, JUN, MYB, RAS y ABL. Otros oncogenes ilustrativos son bien conocidos en la técnica y varios de dichos ejemplos se describen en, por ejemplo, The Genetic Basis of Human Cancer (Vogelstein, B. y Kinzler, K. W. eds. McGraw-Hill, Nueva York, N. Y., 1998). Otros genes regulados positivamente incluyen el factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona, HOMG4/URG); heparanasa (HPA/HPR1); Jagged 1 (síndrome de Alagille, AGS/AHD); molécula de adhesión de células plaquetarias/endoteliales (antígeno CD31, CD31/PECAM-1); factor de crecimiento transformante, alfa (TFGA); y factor de crecimiento endotelial vascular C (Flt4-L/VRP). También se pueden usar homólogos de dichos genes.

Se pueden usar diversas estrategias para la atenuación de genes conocidas en la técnica para inhibir la expresión génica (p. ej., la expresión de genes asociados a CSC). Por ejemplo, se pueden usar estrategias de atenuación de

genes que utilizan rutas de interferencia de ARN (iARN) y/o microARN (miARN), incluyendo ARN interferente pequeño (ARNip), ARN en horquilla pequeño (ARNhc), ARN bicatenario (ARNbc), miRNA y otras moléculas basadas en ácidos nucleicos interferentes pequeños conocidas en la técnica. En una opción, se usan modalidades de iARN basadas en vectores (p. ej., construcciones de expresión de ARNhc o ARNhc-mir) para reducir la expresión de un gen (p. ej., uno asociado a CSC) en una célula. En algunas opciones, las composiciones terapéuticas de la divulgación comprenden un vector plasmídico aislado (p. ej., cualquier vector plasmídico aislado conocido en la técnica o divulgado en el presente documento) que expresa un ácido nucleico de interferencia pequeño tal como un ARNhc. El plásmido aislado puede comprender un promotor específico de tumor, p. ej., específico de melanoma, unido operativamente a un gen que codifica el ácido nucleico de interferencia pequeño, p. ej., un ARNhc. En algunos casos, el vector plasmídico aislado está empaquetado en un virus capaz de infectar al individuo. Los virus ilustrativos incluyen adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados y otros que se conocen en la técnica y desvelados en el presente documento.

Se podría emplear una amplia gama de modalidades basadas en ARNi para inhibir la expresión de un gen en una célula, tales como oligonucleótidos basados en ARNip y/o oligonucleótidos basados en ARNip alterados. Los oligonucleótidos basados en ARNip alterados son los modificados para alterar la potencia, la afinidad diana, el perfil de seguridad y/o la estabilidad, por ejemplo, para hacerlos resistentes o parcialmente resistentes a la degradación intracelular. Pueden realizarse modificaciones, tales como fosforotioatos, por ejemplo, en los oligonucleótidos para aumentar la resistencia a la degradación por nucleasa, la afinidad de unión y/o la captación. Además, la hidrofobización y la bioconjugación potencian la administración y el direccionamiento de ARNip (De Paula *et al.*, RNA. 13 (4): 431-56, 2007) y ARNip con nucleótidos de ribo-difluorotolulilo mantienen la actividad silenciadora de genes (Xia *et al.*, ASC Chem. Biol. 1 (3): 176-83, (2006)). Se han generado ARNip con oligorribonucleósidos unidos a amida que son más resistentes a la degradación por nucleasa S1 que ARNip no modificados (Iwase R *et al.* 2006 Nucleic Acids Symp Ser 50: 175-176). Además, la modificación de los ARNip en la posición 2' de azúcar y el enlace fosfodiéster confiere mejor estabilidad en suero sin pérdida de eficacia (Choung *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 342 (3): 919-26, 2006). Otras moléculas que se pueden usar para inhibir la expresión de un gen (p. ej., un gen asociado a CSC) incluyen ácidos nucleicos con sentido y antisentido (monocatenarios o bicatenarios), ribozimas, péptidos, ADNzimas, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), oligonucleótidos formadores de triple hélice, anticuerpos y aptámeros y una forma o formas modificadas de los mismos dirigidos a secuencias en el gen o genes, transcritos de ARN o proteínas. Las estrategias antisentido y de supresión de ribozimas han conducido a la reversión de un fenotipo tumoral al reducir la expresión de un producto génico o al escindir un transcrito mutante en el sitio de la mutación (Carter y Lemoine Br. J. Cancer. 67 (5): 869-76, 1993; Lange *et al.*, Leukemia. 6 (11): 1786-94, 1993; Valera *et al.*, J. Biol. Chem. 269 (46): 28543-6, 1994; Dosaka-Akita *et al.*, Am. J. Clin. Pathol. 102 (5): 660-4, 1994; Feng *et al.*, Cancer Res. 55 (10): 2024-8, 1995; Quattrone *et al.*, Cancer Res. 55 (1): 90-5, 1995; Lewin *et al.*, Nat Med. 4 (8): 967-71, 1998). Las ribozimas también se han propuesto como un medio tanto para inhibir la expresión génica de un gen mutante como para corregir el mutante mediante un corte y empalme dirigido en *trans* (Sullenger y Cech Nature 371 (6498): 619-22, 1994; Jones *et al.*, Nat. Med. 2 (6): 643-8, 1996). La actividad de las ribozimas se puede aumentar mediante el uso de, por ejemplo, proteínas de unión a ácido nucleico inespecíficas u oligonucleótidos facilitadores (Herschlag *et al.*, Embo J. 13 (12): 2913-24, 1994; Jankowsky y Schwenzner Nucleic Acids Res. 24 (3): 423-9, 1996). Se han sugerido ribozimas de múltiples dianas (conectadas o aleatorias) como un medio para mejorar la eficacia de las ribozimas para la supresión génica (Ohkawa *et al.*, Nucleic Acids Symp Ser. (29): 121-2, 1993).

También se han investigado enfoques de triple hélice para la supresión de genes específicos de secuencia. Se ha descubierto en algunos casos que los oligonucleótidos formadores de triple hélice se unen de una manera específica de secuencia (Postel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 (18): 8227-31, 1991; Duval-Valentin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (2): 504-8, 1992; Hardenbol y Van Dyke Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (7): 2811-6, 1996; Porumb *et al.*, Cancer Res. 56 (3): 515-22, 1996). De manera similar, se ha mostrado que los ácidos nucleicos peptídicos inhiben la expresión génica (Hanvey *et al.*, Antisense Res. Dev. 1 (4): 307-17, 1991; Knudsen y Nielson Nucleic Acids Res. 24 (3): 494-500, 1996; Taylor *et al.*, Arch. Surg. 132 (11): 1177-83, 1997). Las poliamidas de unión al surco menor pueden unirse de una manera específica de secuencia a dianas de ADN y, por lo tanto, pueden representar moléculas pequeñas útiles para la supresión al nivel de ADN (Trauger *et al.*, Chem. Biol. 3 (5): 369-77, 1996). Además, se ha obtenido supresión mediante interferencia al nivel de proteína usando péptidos y anticuerpos mutantes negativos dominantes (Herskowitz Nature 329 (6136): 219-22, 1987; Rimsky *et al.*, Nature 341 (6241): 453-6, 1989; Wright *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (9): 3199-203, 1989). En algunos casos, las estrategias de supresión han conducido a una reducción en los niveles de ARN sin una reducción simultánea de proteínas, mientras que, en otros, las reducciones de ARN se han reflejado en reducciones de proteínas. La amplia gama de estrategias de supresión que pueden emplearse incluye el uso de aptámeros de ADN y/o ARN que pueden seleccionarse para dirigirse a una proteína de interés (p. ej., un polipéptido asociado a CSC).

También se proporcionan métodos para administrar un agente terapéutico a una célula madre cancerosa. Los métodos implican una etapa de poner en contacto una célula madre cancerosa con una molécula aislada que se une selectivamente con un polipéptido de la superficie celular codificado por un gen asociado a CSC, tal como los seleccionados del grupo establecido en la tabla 4. El gen asociado a CSC se puede seleccionar del grupo que consiste en: ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8. La célula madre cancerosa puede estar *in vivo* o *in vitro*. Las moléculas aisladas que se unen con

polipéptidos asociados a CSC en la superficie de una célula madre cancerosa se pueden incorporar a un compartimento intracelular de la célula madre cancerosa.

5 Las células madre cancerosas incluyen células madre de un carcinoma de colon, un cáncer pancreático, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un carcinoma de células escamosas, un cáncer de cuello uterino, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de pulmón microcítico, un carcinoma de vejiga, un carcinoma de células escamosas, un carcinoma basocelular, un adenocarcinoma, un carcinoma de glándula sudorípara, un carcinoma de glándula sebácea, un carcinoma papilar, un adenocarcinoma papilar, un cistadenocarcinoma, un carcinoma medular, un carcinoma broncogénico, un cáncer renal, p. ej., carcinoma de células renales, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma de conducto biliar, un coriocarcinoma, un seminoma, un carcinoma embrionario, un tumor de Wilms o un tumor testicular. En opciones específicas, las células madre cancerosas son células madre de melanoma. Las células madre cancerosas incluyen células ABCB5⁺ y células ABCB5⁻. Un experto habitual en la materia conocerá células madre de otros cánceres.

15 Los métodos de tratamiento de la divulgación implican administrar composiciones que comprenden moléculas aisladas, o combinaciones de diferentes moléculas aisladas, que se unen específicamente con polipéptidos asociados a CSC (polipéptidos codificados por el gen asociado a CSC) para tratar el cáncer, p. ej., melanoma, en un individuo. Cuando el polipéptido asociado a CSC está asociado con la superficie extracelular de una célula, p. ej., una célula madre cancerosa, p. ej., una célula madre de melanoma, la molécula aislada puede unirse al polipéptido asociado a CSC y, por ejemplo, actuar como vehículo para dirigir específicamente agentes terapéuticos (moléculas terapéuticas) a la célula. En algunas opciones, las moléculas aisladas que se unen con un polipéptido asociado a CSC en la superficie de una célula se incorporan en un compartimento intracelular de la célula unido a una molécula secretada, tal como un factor de crecimiento que puede ayudar al tumor (tal como los enumerados en la tabla 1.2). Las moléculas aisladas que interactúan con proteínas desreguladas pueden usarse solas como productos terapéuticos o en combinación con otros productos terapéuticos.

30 Como se usa en el presente documento, el tratamiento del cáncer incluye prevenir el desarrollo de un cáncer, reducir los síntomas de un cáncer y/o inhibir, ralentizar el crecimiento o prevenir el crecimiento adicional de un cáncer existente. El tratamiento puede incluir alivio, cura y/o mantenimiento de una cura (es decir, prevención o retardo de la recaída) de un trastorno, p. ej., cáncer. El tratamiento después de iniciarse un trastorno tiene como objetivo reducir, aliviar o eliminar por completo el trastorno y/o sus síntomas asociados, para evitar que empeore, para ralentizar la velocidad de progresión o para evitar que el trastorno reaparezca una vez que se haya eliminado inicialmente (es decir, para evitar una recaída).

35 Los cánceres incluyen, por ejemplo, un carcinoma de colon, un cáncer pancreático, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un carcinoma de células escamosas, un cáncer de cuello uterino, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de pulmón microcítico, un carcinoma de vejiga, un carcinoma de células escamosas, un carcinoma basocelular, un adenocarcinoma, un carcinoma de glándula sudorípara, un carcinoma de glándula sebácea, un carcinoma papilar, un adenocarcinoma papilar, un cistadenocarcinoma, un carcinoma medular, un carcinoma broncogénico, un carcinoma de células renales, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma de conducto biliar, un coriocarcinoma, un seminoma, un carcinoma embrionario, un tumor de Wilms o un tumor testicular. En determinadas opciones, el cáncer es melanoma.

45 La divulgación, en algunos aspectos, se refiere a una molécula aislada que se une selectivamente con un polipéptido codificado por un gen asociado a CSC expuesto en la tabla 4 y que se conjuga con un agente terapéutico. En algunos casos, el gen asociado a CSC se selecciona del grupo que consiste en: ANK2, NCKAP1L, PTPRE, PTPRS, SBF1, SCN3A, SGCA, SGCB, SLC2A11, SLC2A8, SLC4A1, STX3 y TBC1D8. También se desvelan composiciones que comprenden las moléculas aisladas anteriores.

50 Como se usa en el presente documento, una "molécula aislada" es una molécula tal como un polipéptido, ácido nucleico, polisacárido, fármaco, nucleoproteína, lipoproteína, glucoproteína, esteroide y lípido que se aísla de su entorno natural o se produce de manera sintética. En algunas opciones, la molécula aislada es un ligando de un polipéptido asociado a CSC. En otras opciones, la molécula aislada es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Como se desvela en el presente documento, el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, F(ab')₂, Fab, Fd, Fv o fragmentos Fv de cadena sencilla. En algunas opciones, una molécula aislada puede tener utilidad terapéutica sola y no es necesario que se conjuga con un agente terapéutico. Por ejemplo, una molécula aislada puede unirse con un receptor de superficie celular que es un polipéptido asociado a CSC y actuar como un antagonista o inhibidor competitivo del receptor (p. ej., para inhibir una ruta de señalización).

65 En algunas opciones, las moléculas aisladas se conjugan con agentes terapéuticos. Como se usa en el presente documento, un "agente terapéutico" es una molécula tal como un polipéptido, ácido nucleico, polisacárido, fármaco, nucleoproteína, lipoproteína, glucoproteína, esteroide y lípido que es capaz de alterar el estado de una célula (p. ej., destruir una célula, inhibir el crecimiento de una célula) con fines terapéuticos. Un agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una toxina, un ácido nucleico de interferencia pequeño o un agente quimioterapéutico. Como alternativa, el

agente terapéutico se puede administrar junto con la molécula. Junto se refiere a la administración al mismo sujeto. La administración real puede ser al mismo tiempo o en un momento diferente o en el mismo o diferente vehículo de administración.

5 Las toxinas incluyen, por ejemplo, radioisótopos tales como ²²⁵Ac, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ¹⁸⁶Rh, ¹⁸⁸Rh, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ⁶⁷Cu, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁷Br, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Bo, ⁶⁴Cu, ²¹²Pb, ²²⁴Ra, ²²³Ra y otros conocidos en la técnica. Las toxinas químicas adecuadas incluyen miembros de la familia de moléculas de enediina, tales como calicheamicina y esperamicina, así como lectinas venenosas, toxinas vegetales tales como ricina, abrina, modeccina, botulina y toxinas diftéricas. Por supuesto, las combinaciones de las diversas toxinas también se podrían acoplar a una molécula aislada, p. ej., un anticuerpo, adaptándose de este modo a citotoxicidad variable. Se prevé que el acoplamiento de una o más moléculas de toxina a la molécula aislada, p. ej., anticuerpo, incluya muchos mecanismos químicos, por ejemplo, unión covalente, unión por afinidad, intercalación, enlace coordinado y formación de complejos.

15 Los agentes quimioterapéuticos incluyen los siguientes compuestos o clases de compuestos: acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; adriamicina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; buniodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; DACA (N-[2-(dimetil-amino)etil]acridina-4-carboxamida); dactinomicina; clorhidrato de danurrobicina; daunomicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; ifesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; aceite etiodizado I 131; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; 5-FdUMP; fluocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; oro Au 198; hidroxurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofoquina; interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-la; interferón gamma-lb; ioplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprorelina; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamincina; ormaplatino; oxisurano; pegaspargasa de paclitaxel; peliomincina; pentamustina; sulfato de peplomincina; perfosfamida; pipobromano; piposulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfíromincina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromincina; clorhidrato de puromincina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; Safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; cloruro de estroncio Sr 89; sulofenur; talisomicina; taxano; taxoide; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporquina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; timitaq; tiazofurina; tirapazamina; tomudex; TOP-53; clorhidrato de topotecán; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; vinblastina; sulfato de vinblastina; vincristina; sulfato de vincristina, vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorrubicina; 2-clorodesoxiadenosina; 2'-desoxiformicina; 9-aminocamptotecina; raltitrexed; ácido N-propargil-5,8-didesazafólico, 2-cloro-2'-arabino-fluoro-2'-desoxiadenosina; 2-cloro-2'-desoxiadenosina; anisomicina; tricostatina A; hPRL-G129R; CEP-751; linomida; isetionato de piritrexim; sitoglusida; clorhidrato de tamsulosina y pentomona.

50 La divulgación, en algunos aspectos, proporciona equipos que comprenden uno o más recipientes que albergan una o más de las composiciones de la divulgación. El equipo puede diseñarse para facilitar el uso de los métodos descritos en el presente documento por investigadores y puede tomar muchas formas. Cada una de las composiciones del equipo, cuando corresponda, puede proporcionarse en forma líquida (p. ej., en solución) o en forma sólida, (p. ej., un polvo seco). En determinados casos, algunas de las composiciones pueden ser constituyentes o procesables de otra forma (p. ej., en una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado u otra especie (por ejemplo, agua o un medio de cultivo celular), que pueden proporcionarse o no con el equipo. Los equipos también pueden incluir muestras de referencia. Como se usa en el presente documento, las "instrucciones" pueden definir un componente de instrucción y/o promoción y normalmente implican instrucciones escritas en o asociadas con el envase de la divulgación. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada de cualquier manera, de modo que un usuario reconocerá claramente que las instrucciones deben estar asociadas con el equipo, por ejemplo, audiovisual (p. ej., cinta de vídeo, DVD, etc.), Internet y/o comunicaciones basadas en web, etc. las instrucciones escritas pueden estar en una forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, pudiendo dichas instrucciones reflejar también la autorización por el organismo de la fabricación, el uso o la venta para administración animal.

El equipo puede contener uno cualquiera o más de los componentes descritos en el presente documento en uno o más recipientes. Como ejemplo, en una opción, el equipo puede incluir instrucciones para mezclar uno o más componentes del equipo y/o aislar y mezclar una muestra y aplicarla a un sujeto. El equipo puede incluir un recipiente que albergue los agentes descritos en el presente documento. Los agentes pueden estar en forma de líquido, gel o sólido (polvo). Los agentes pueden prepararse de manera estéril, envasarse en una jeringa y enviarse refrigerados. Como alternativa, pueden albergarse en un vial u otro recipiente para su almacenamiento. Un segundo recipiente puede tener otros agentes preparados de manera estéril. Como alternativa, el equipo puede incluir los principios activos premezclados y enviados en una jeringa, vial, tubo u otro recipiente. El equipo puede tener uno o más o todos los componentes necesarios para administrar los agentes a un animal, tal como una jeringa, dispositivos de aplicación tópica o tubos con aguja iv y bolsa, en particular en el caso de los equipos para el tratamiento de individuos con cáncer.

Las composiciones y los agentes terapéuticos se pueden administrar simultánea o secuencialmente. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, se pueden administrar en las mismas formulaciones o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se administran secuencialmente entre sí y con los moduladores, cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y los moduladores se separa temporalmente. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser cuestión de minutos o puede ser más larga.

Las composiciones de la presente divulgación contienen preferiblemente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para hacer que el compuesto o la mezcla se pueda administrar por vía oral como un comprimido, una cápsula o una píldora, o por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intramuscular o por vía subcutánea, o por vía transdérmica. Los principios activos se pueden mezclar o combinar con cualquier vehículo o excipiente convencional, farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden ser estériles.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción y similares. Se conoce bien en la técnica el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las composiciones de la presente divulgación, se contempla su uso en la formulación terapéutica. También se pueden incorporar principios activos complementarios en las formulaciones farmacéuticas. Se dice que una composición es un "vehículo farmacológicamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos en la técnica.

Los expertos en la materia entenderán que cualquier modo de administración, vehículo o transportador empleado convencionalmente y que es inerte con respecto al agente activo puede utilizarse para preparar y administrar las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. Son ilustrativos de dichos métodos, vehículos y transportadores los descritos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^o ed. (1990). Los expertos en la materia, habiendo estado expuesto a los principios de la divulgación, no experimentarán ninguna dificultad para determinar vehículos, excipientes y transportadores adecuados y apropiados o para combinar los principios activos con los mismos para formar las composiciones farmacéuticas de la divulgación.

Una cantidad eficaz, también denominada cantidad terapéuticamente eficaz, es una cantidad suficiente para aliviar al menos un efecto adverso asociado con la expresión, o expresión reducida, de un gen asociado a CSC en una célula o en un individuo que necesite dicha inhibición o complementación. La cantidad terapéuticamente eficaz para incluir en composiciones farmacéuticas depende, en cada caso, de varios factores, p. ej., el tipo, la talla y el estado del paciente para tratar, el modo previsto de administración, la capacidad del paciente para incorporar la forma de dosificación prevista, etc. En general, se incluye una cantidad de agente activo en cada forma de dosificación para proporcionar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg y preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg. Un experto habitual en la materia podría determinar empíricamente una cantidad terapéuticamente eficaz adecuada.

En combinación con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, al elegir entre los diversos compuestos activos y valorar factores tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no provoque toxicidad sustancial y, no obstante, sea completamente eficaz para tratar al individuo en particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se trate, el agente terapéutico particular que se administra, la talla del individuo o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto habitual en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un ácido nucleico particular y/u otro agente terapéutico sin necesidad de experimentación excesiva.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier vía adecuada para administrar medicamentos. Están disponibles diversas vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del

agente o agentes particulares seleccionados, la afección particular que se trate y la dosis necesaria para eficacia terapéutica. Los métodos de la presente divulgación, en términos generales, puede practicarse usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de una respuesta inmunitaria sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables. Los modos de administración preferidos se analizan en el presente documento. Para su uso en terapia, se puede administrar una cantidad eficaz del ácido nucleico y/u otro agente terapéutico a un individuo por cualquier modo que administre el agente a la superficie deseada, p. ej., mucoso, sistémico.

La administración de la composición farmacéutica de la presente divulgación puede realizarse por cualquier medio conocido por el experto en la materia. Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, subcutánea, ocular, vaginal y rectal. Las vías sistémicas incluyen oral y parenteral. Varios tipos de dispositivos se usan regularmente para administración por inhalación. Estos tipos de dispositivos incluyen inhaladores dosificadores (MDI), MDI accionado por la respiración, inhalador de polvo seco (IPS), cámaras espaciadoras/de retención en combinación con MDI y nebulizadores.

En algunos casos, se preparan compuestos de la divulgación en un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido de la divulgación es un liposoma. Los liposomas son vasos de membrana artificial que son útiles como vector de administración *in vivo* o *in vitro*. Se ha mostrado que las vesículas unilamelares grandes (LUV), cuyo tamaño varía de 0,2 a 4,0 μm , pueden encapsular macromoléculas grandes. Se pueden encapsular ARN, ADN y viriones intactos dentro del interior acuoso y administrarse a las células en una forma biológicamente activa. Fraley *et al.* (1981) Trends Biochem Sci 6: 77.

Los liposomas pueden dirigirse a un tejido particular mediante el acoplamiento del liposoma con una molécula de unión específica, tal como una que se une con un polipéptido asociado a CSC. Las moléculas de unión que pueden ser útiles para dirigir un liposoma a, por ejemplo, una célula madre cancerosa incluyen, pero sin limitación, moléculas intactas o fragmentos de moléculas, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos, que interactúan con polipéptidos asociados a CSC en la superficie de células madre cancerosas. Dichas moléculas de unión pueden identificarse fácilmente mediante ensayos de unión bien conocidos por los expertos en la materia.

Están disponibles en el mercado formulaciones lipídicas para transfección de QIAGEN, por ejemplo, como EFFECTENE™ (un lípido no liposómico con un potenciador especial de condensación de ADN) y SUPERFECT™ (una tecnología dendrímica de acción novedosa).

Los liposomas están disponibles en el mercado de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que están formados por lípidos catiónicos tales como N-[1-(2,3 dioleiloxi)-propil]-N, N, cloruro de N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB). Los métodos para preparar liposomas son bien conocidos en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. También se han revisado liposomas en Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3: 235-241.

Determinados lípidos catiónicos, incluyendo en particular metilsulfato de N-[1-(2,3dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), parecen ser especialmente ventajosos cuando se combinan con los análogos de oligonucleótidos modificados de la divulgación.

En una opción, el vehículo es una micropartícula o un implante biocompatible que es adecuado para la implantación o administración al receptor mamífero. Se describen implantes bioerosionables ilustrativos que son útiles de acuerdo con este método en la solicitud internacional de PCT n.º PCT/US/03307 (publicación n.º WO95/24929, titulado "Polymeric Gene Delivery System". El documento PCT/US/0307 describe una matriz polimérica biocompatible, preferentemente biodegradable para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor adecuado. La matriz polimérica se puede usar para lograr la liberación sostenida del agente terapéutico en el individuo.

La matriz polimérica está preferentemente en forma de una micropartícula tal como una microesfera (p. ej., en donde un agente terapéutico se dispersa a través de una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (p. ej., en donde un agente terapéutico se almacena en el núcleo de una cubierta polimérica). Otras formas de la matriz polimérica para contener el agente terapéutico incluyen películas, recubrimientos, geles, implantes y endoprótesis vasculares. El tamaño y la composición del dispositivo de matriz polimérica se seleccionan para dar como resultado cinética de liberación favorable en el tejido en el que se introduce la matriz. El tamaño de la matriz polimérica se selecciona además según el método de suministro que se va a usar, normalmente inyección en un tejido o administración de una suspensión mediante aerosol en las áreas nasales y/o pulmonares. Preferentemente, cuando se usa una vía de aerosol, la matriz polimérica y el agente terapéutico están abarcados en un vehículo tensioactivo. La composición de matriz polimérica se puede seleccionar para que tenga velocidades de degradación favorables y también para estar formada por un material que sea bioadhesivo, para aumentar adicionalmente la eficacia de la transferencia cuando la matriz se administra a una superficie nasal y/o pulmonar que ha sufrido una lesión. La composición de la matriz también se puede seleccionar para no degradar, sino más bien, para liberar por difusión durante un periodo prolongado de tiempo. Se desvelan microesferas biocompatibles que son adecuadas para administración, tal como

administración oral o mucosa, en Chickering *et al.* (1996) *Biotech Bioeng* 52: 96-101 y Mathiowitz E *et al.* (1997) *Nature* 386: 410-414 y solicitud de patente PCT WO97/03702.

Se pueden usar matrices poliméricas tanto biodegradables como no biodegradables para administrar los agentes terapéuticos a un individuo. Se prefieren las matrices biodegradables. Dichos polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona en función del periodo de tiempo durante el que se desea la liberación, en general en aproximadamente de varias horas a un año o más. Normalmente, lo más deseable es la liberación durante un periodo que varía entre varias horas y de tres a doce meses, en particular para los agentes de ácido nucleico. El polímero está opcionalmente en forma de un hidrogel que puede absorber hasta aproximadamente 90 % de su peso en agua y, además, opcionalmente está reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

Los polímeros bioadhesivos de interés particular incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, (1993) 26: 581-587. Estos incluyen 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).

Si el agente terapéutico es un ácido nucleico, también puede ser deseable el uso de agentes de compactación. Los agentes de compactación también se pueden usar solos o en combinación con un vector biológico o químico/físico. Un "agente de compactación", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente, tal como una histona, que neutraliza las cargas negativas en el ácido nucleico y, por lo tanto, permite la compactación del ácido nucleico en un gránulo fino. La compactación del ácido nucleico facilita la captación del ácido nucleico por la célula diana. Los agentes de compactación pueden usarse solos, es decir, para administrar un ácido nucleico en una forma que es captada más eficazmente por la célula o, más preferentemente, en combinación con uno o más de los vectores descritos anteriormente.

Otras composiciones ilustrativas que pueden usarse para facilitar la captación de un ácido nucleico incluyen fosfato de calcio y otros mediadores químicos del transporte intracelular, composiciones de microinyección, composiciones de electroporación y recombinación homóloga (p. ej., para integrar un ácido nucleico en una ubicación preseleccionada dentro del cromosoma de la célula diana).

Los compuestos pueden administrarse solos (p. ej., en solución salina o tampón) o usando cualquier vehículo de administración conocido en la técnica. Por ejemplo, se han descrito los siguientes vehículos de administración: cocleados; emulsomas; ISCOM; liposomas; vectores bacterianos vivos (p. ej., *Salmonella*, *Escherichia coli*, bacilo de Calmette-Guérin, *Shigella*, *Lactobacillus*); vectores víricos vivos (p. ej., vaccinia, adenovirus, herpes simple); microesferas; vacunas de ácido nucleico; polímeros (p. ej., carboximetilcelulosa, quitosano); anillos poliméricos; proteasomas; fluoruro de sodio; plantas transgénicas; virosomas; y, partículas de tipo vírico.

Las formulaciones de la divulgación se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que habitualmente pueden contener concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

La expresión vehículo farmacéuticamente aceptable significa uno o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles que son adecuados para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. El término vehículo indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también se pueden mezclar con los compuestos de la presente divulgación, y entre sí, de tal manera que no haya interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Para administración oral, el compuesto se puede formular fácilmente combinando el compuesto o los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten formular los compuestos de la divulgación como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para su ingestión oral por un individuo que se va a tratar. Pueden obtenerse preparaciones farmacéuticas para su uso oral como excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Son excipientes adecuados, 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, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, 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 vehículo.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol,

polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

5 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios activos mezclados con carga, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, 10 tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. También se pueden usar microesferas formuladas para administración oral. Dichas microesferas han sido bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

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

Para administración por inhalación, los compuestos según la presente divulgación pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol en envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, 20 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 su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

25 Los compuestos, cuando es deseable suministrarlos de manera sistémica, pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, p. ej., mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones 30 en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como 35 suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la 40 preparación de soluciones muy concentradas.

Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril apirógena, antes de su uso.

45 Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contengan bases para supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también pueden formularse como una 50 preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción larga pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes adecuados en fase sólida o 55 de gel. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Son formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas 60 para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, aplicadas sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, microgránulos para implantar en la piel o secados sobre un objeto afilado para aplicarlos por raspado de la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente 65 excipientes y aditivos y/o adyuvantes tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hincharse, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes como se ha descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en diversos sistemas de administración de fármacos. Para

una breve revisión de métodos para la administración de fármacos, véase Langer R (1990) Science 249: 1527-1533.

Los compuestos pueden administrarse por sí solos (puros) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usen en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichas sales incluyen, pero sin limitación, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Además, dichas sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalinotérreas, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo de ácido carboxílico.

Los agentes tamponantes adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar los compuestos con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los compuestos con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido o ambos, y después, si fuera necesario, dando forma al producto. Son unidades de dosis líquidas viales o ampollas. Son unidades de dosis sólidas comprimidos, cápsulas y supositorios.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de liberación programada, liberación retardada o liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de los compuestos, aumentando la conveniencia para el individuo y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración de liberación y son conocidos por los expertos en la materia. Incluyen sistemas de base polimérica tales como poli(lactida-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Se describen microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos, incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos con aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación: (a) sistemas erosivos en los que un agente de la divulgación está contenido en una forma dentro de una matriz tal como las descritas en las patentes de los Estados Unidos n.º 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152, y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo se infiltra a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos n.º 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden usar sistemas de administración de hardware basado en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

Ejemplos

Entre los numerosos genes asociados a CSC están los genes implicados en la vasculogénesis y la angiogénesis. Por ejemplo, los análisis de expresión génica global validados por determinaciones de ARNm y proteínas revelaron una presentación preferente de genes para el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGFR-1) y miembros relacionados de cascadas de señalización implicadas en vasculogénesis y angiogénesis en MMIC ABCB5⁻. *In vitro*, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) indujo la expresión del marcador asociado al endotelio CD144 (VE-cadherina) en MMIC ABCB5⁺ que expresan VEGFR-1 pero no poblaciones generales de melanoma ABCB5⁻ VEGFR-1-negativo, lo que indica una capacidad única de las CSC para la diferenciación vasculogénica dependiente de la señalización de VEGF/VEGFR-1. *In vivo*, los tumores iniciados a partir de células de melanoma procedentes del paciente o cultivos de melanoma establecidos por xenotrasplante en hipodermis murina o por inyección intradérmica en piel humana en receptores murinos quiméricos formaron canales de tipo vaso que expresaban proteínas y ARNm de ABCB5 perfundidos también detectados en muestras clínicas de melanoma que expresaron conjuntamente CD144 y el marcador mimético vasculogénico TIE-1⁴. El inicio del tumor en la piel humana por células de melanoma humano que expresan transgenes fluorescentes confirmó que los canales CD144+ tienen origen en el melanoma. Por otra parte, el agotamiento de MMIC en injertos tumorales a piel humana redujo significativamente la formación de canales y dio como resultado crecimiento tumoral atenuado. Los resultados de los inventores identifican la vasculogénesis del melanoma impulsada por MMIC ABCB5⁺ como un nuevo mecanismo por el que CSC puede promover el crecimiento tumoral. Asimismo, sugieren que la vasculogénesis dependiente de MMIC representa una nueva diana de CSC para los inhibidores de la angiogénesis dirigidos a VEGF/VEGFR-1.

Ejemplo 1 Materiales y métodos

Células de melanoma y métodos de cultivo. Las líneas celulares de melanoma cutáneo humano establecidas G3361, A375, MALME-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-5, SK-MEL-28, UACC-62, UACC-257, M14 y MDA-MB-435 se

cultivaron como se ha descrito^{3,5,23}. Se obtuvieron células clínicas de melanoma cutáneo de una muestra quirúrgica según protocolos de investigación de sujetos humanos aprobados por los IRB de la Facultad de Medicina de la Universidad de Würzburg o el Instituto Wistar, Filadelfia, PA. como se ha descrito anteriormente³. Las líneas celulares de melanoma uveal humano establecidas MUM-2B y MUM-2C fueron un regalo de la Dra. Mary J. Hendrix, Universidad Northwestern, y se cultivaron como se ha descrito¹⁶.

Aislamiento celular. Se aislaron células purificadas ABCB5⁺(ABCB5⁺) mediante selección positiva y se generaron poblaciones celulares empobrecidas en ABCB5⁺ (ABCB5⁻) eliminando células ABCB5⁺ usando marcaje de mAb anti-ABCB5 (clon 3C2-1D12²³) y clasificación de células por perlas magnéticas como se ha descrito³. En resumen, se marcaron células de melanoma humanas G3361, A375 MUM-2B o MUM-2C o suspensiones de células individuales procedentes de muestras clínicas de melanoma con mAb anti-ABCB5 durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces para eliminar el exceso de anticuerpos, seguido de incubación con microperlas magnéticas recubiertas con mAb secundarios anti-IgG de ratón durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces para eliminar el exceso de microperlas magnéticas y después se clasificaron en fracciones celulares ABCB5⁺ y ABCB5⁻ mediante separación celular de pase doble en columnas de separación MidiMACS o MiniMACS (dependiendo del número de células) según las recomendaciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se realizaron evaluación de la pureza de aislados de células de melanoma ABCB5⁺ y ABCB5⁻ (empobrecidos en células ABCB5⁺) y determinación de la viabilidad celular después de la clasificación de células magnéticas y produjeron resultados similares a los descritos anteriormente³.

Análisis de micromatrices de expresión génica global. Se realizaron análisis de micromatrices en subconjuntos celulares purificados ABCB5⁺ ($n = 5$) y ABCB5⁻ ($n = 5$) derivados de las líneas celulares de melanoma humano establecidas G3361 y A375 y de tres muestras clínicas de melanoma definidas previamente caracterizadas en el laboratorio de los inventores con respecto a la expresión de ABCB5 y el fenotipo de MMIC en ensayos de xenotrasplantes de melanoma humano³. El ARN total se extrajo, se procesó y se hibridó como se ha descrito anteriormente¹⁰ en micromatrices HG-U133Plus2 GeneChip humanas Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA). El análisis estadístico de los resultados de micromatrices se realizó como se ha descrito anteriormente¹⁰. El conjunto de datos de expresión en su totalidad estará disponible a través de GEO (omnibus de expresión génica). Se generaron redes de genes funcionales usando análisis de rutas Ingenuity (Ingenuity® Systems, ingenuity.com), mapeando cada identificador génico en su objeto génico correspondiente en la base de conocimiento de rutas Ingenuity. Estos genes de enfoque se superpusieron en una red molecular global desarrollada a partir de la información contenida en la base de conocimiento de rutas Ingenuity. Después se generaron redes de genes de enfoque de manera algorítmica en función de su conectividad y posteriormente se analizaron para identificar las funciones biológicas que eran más significativas para los genes en la red.

Extracción de ARN y PCR de transcriptasa inversa. El ARN total se aisló de células de melanoma humano ABCB5⁺ y ABCB5⁻ usando columnas RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA). Se realizaron reacciones de síntesis de ADNc convencionales usando 5 µg de ARN y el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript para PCR de transcriptasa inversa (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Para análisis por PCR, se añadieron 5 µl de producto de primera cadena diluido (~100 ng de ADNc) a 45 µl de mezcla de reacción de PCR que contenían 5 unidades de Superscript II (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se realizó el siguiente programa de PCR: desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, después ciclos 35 veces a 94 °C durante 1 minuto, 53 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y posteriormente extensión a 72 °C durante 10 minutos. Las secuencias de cebadores fueron las siguientes: cebador directo de PTK2, 5'-TGCCTTTTACTTTTCGTGTGG-3' (SEQ ID NO: 1); cebador inverso de PTK2 5'-CCAAATTCCTGTTTTGCTTCA-3' (SEQ ID NO: 2); cebador directo de MET 5'-CCCCACCTTATCCTGACGTA-3' (SEQ ID NO: 3); cebador inverso de MET 5'-CGTGTGCCACCTCATCATC-3' (SEQ ID NO: 4); cebador directo de NRP2 5'-GAGGCAGGGGAAAATAGAGG-3' (SEQ ID NO: 5); cebador inverso de NRP2 5'-TCTCCCGAAAGGTTGAAATG-3' (SEQ ID NO: 6); cebador directo de ETS1 5'-CGCTTACTCTGTTGGGGTCT-3' (SEQ ID NO: 7); cebador inverso de ETS1 5'-TCTCCAGCAAAAATGATGTGC-3' (SEQ ID NO: 8); cebador directo de FLT1 5'-TGGCAACTGCTTTTATGTTCTG-3' (SEQ ID NO: 9); cebador inverso de FLT1 5'-TCCATAGGGTGATGGTCAAA-3' (SEQ ID NO: 10). Los productos de reacción se resolvieron en un gel de agarosa LE al 1 % (Ambion, Austin, TX) y se fotografiaron. Se usaron cebadores de β-actina como controles para garantizar la integridad del ARN.

Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real. Se aisló ARN total de células de melanoma humano no segregadas o clasificadas usando el equipo de aislamiento de ARN de uso en qPCR RT² (SABiosciences, Frederick, MD). Se realizaron reacciones convencionales de síntesis de ADNc usando 1 µg de ARN y el equipo de primera cadena RT² para PCR de transcriptasa inversa (SABiosciences) según las instrucciones del fabricante. El producto de transcriptasa inversa (1 µl) se amplificó mediante pares de cebadores específicos para ABCB5⁵. Se usó β-actina como control de normalización. Los cebadores para la detección de ABCB5 (número de referencia de Genebank AY234788) fueron 5'-GCTGAGGAATCCACCCAATCT-3' (directo) (SEQ ID NO: 11) y 5'-AGCCTGAATGGCCTTTTGTG-3' (inverso) (SEQ ID NO: 12). Los cebadores para la detección de β-actina fueron 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3' (SEQ ID NO: 13) (directo) y 5'-AGTACTCCGTGTGGATCGGC-3' (inverso) (SEQ ID NO: 14). Las muestras se ensayaron usando química Sybergreen y PCR cinética (detector de secuencia ABI 7300; Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras se amplificaron usando el equipo de reactivos de PCR Sybergreen (Applied Biosystems) según el protocolo del fabricante. Se usaron cebadores con sentido y antisentido a

una concentración final de 10 nM. Las muestras de ADNc se amplificaron en las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación a 94 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 minuto. Todas las muestras se procesaron por triplicado. Las cantidades relativas de transcritos se analizaron usando el método 2 (-Delta Delta C(T)) como se ha descrito anteriormente^{3,5,10}. Se determinaron las diferencias estadísticas entre los niveles de expresión de ARNm usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Un valor de *P* bilateral de *P* < 0,05 se consideró significativo.

Análisis de Western. Se recogieron lisados celulares totales de cultivos en crecimiento logarítmico de las líneas celulares de melanoma humano MALME-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-5, SK-MEL-28, UACC-62, UACC-257, M14 y MDA-MB-435 y se analizaron mediante SDS-PAGE al 8 % y ensayo de Western para detectar los niveles relativos de ABCB5 (mAb 3C2-1D12²³) y alfa-tubulina (clon de mAb DM1A, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), usando densitometría del sistema de captura de imágenes IR LI-COR Odyssey.

Citometría de flujo. Se analizaron células de melanoma G3361, A375, MUM-2B o MUM-2C para determinar la expresión de ABCB5 en superficie mediante incubación con mAb anti-ABCB5 o mAb de control de isotipo durante 30 minutos a 4 °C, seguido de contratinción con Ig de cabra anti-ratón conjugado con FITC o con Ab secundarios de burro anti-IgG de ratón conjugados con APC y citometría de flujo de un solo color en el espectro de emisión de FI 1 (FITC) o FI4 (APC) en un Becton Dickinson FACScan como se ha descrito^{3,5,23}. Se realizó lavado dos veces entre cada etapa. Se realizó análisis de la coexpresión de ABCB5 con el marcador de superficie VEGFR-1 en células de melanoma G3361 mediante citometría de flujo de color doble como se ha descrito³. En resumen, se incubaron células de melanoma durante 30 minutos a 4 °C con mAb anti-ABCB5 o mAb de control de isotipo, seguido de contratinción con Ab secundario de burro anti-IgG de ratón conjugado con APC como anteriormente. Posteriormente, las células se fijaron a 4 °C y después se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con mAb anti-VEGFR-1 conjugado con PE (R&D Systems, Minneapolis, MN) o mAb de control de isotipo conjugado con PE (BD PharMingen, San Diego, CA). Posteriormente se realizó citometría de flujo de color doble con adquisición de emisión de fluorescencia en los espectros de FI4 (APC) y FI2 (PE) en un Becton Dickinson FACScan. Se realizó lavado dos veces entre cada etapa. Se determinaron diferencias estadísticas entre los niveles de expresión de los marcadores usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Un valor de *P* bilateral de *P* < 0,05 se consideró significativo.

Diferenciación vasculogénica *in vitro* y ensayos de formación de tubos. Se ensayó la inducción dependiente de VEGF de la expresión de CD144 y la formación de estructuras tubulares de tipo capilar por células de melanoma G3361 humanas en Matrigel reducido con factor de crecimiento, una preparación de matriz de membrana basal (BD Biosciences, San José, CA). Se añadió Matrigel reducido con factor de crecimiento a portaobjetos de vidrio tratados con cultivo tisular de vasos de poliestireno de ocho cámaras y se permitió que gelatinizara durante 20 minutos a 37 °C. Se sembraron células de melanoma humano purificado ABCB5⁺ o ABCB5⁻ o no segregadas en pocillos de portaobjetos de cultivo a densidades de 5x10⁴ células/cm² en medio 199 que contenía 5 % de FCS¹¹ en presencia o ausencia de VEGF (100 ng/ml). Después de 48 horas de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído/PBS al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente y, después de un lavado exhaustivo con PBS, las células se bloquearon en suero de burro al 5 %/Tween 20 al 0,01 %/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se incubaron las células con Ab policlonal de conejo anti-CD 144 (diluido 1:100; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) durante una noche a 4 °C. Después de un lavado exhaustivo con Tween 20/PBS al 0,01 %, las células se incubaron con Ab secundario de cabra anti-conejo conjugado con Texas red (diluido 1:250; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado con 1XPBS/Tween 20 al 0,01 %, las células se montaron a continuación en Vectashield (Vecta Laboratories, Burlingame, CA) complementado con DAPI 100 ng/ml para visualizar los núcleos. Las células se analizaron mediante microscopia fluorescente usando una fuente de luz fluorescente Mercury de 100 vatios (Microvideo Instruments, Avon, MA) conectada a un microscopio Nikon Eclipse TE 300 (Nikon Instruments, Melville, NY) con el uso de filtros separados para cada fluorocromo. Las imágenes se obtuvieron usando una cámara digital Spot (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI), y el paquete de software Spot 3.3.2. se importó a Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA). Para ensayos de formación de tubos, se sembraron células de melanoma humano no segregadas en pocillos de portaobjetos de cultivo a densidades de 5x10⁴ células/cm² en medio 199 que contenía 5 % de FCS¹¹. Inmediatamente, las células se pretrataron con medio solo, Ab de conejo anti-VEGFR1 (10 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o Ab de control de isotipo de conejo (10 µg/ml; BD Biosciences) a 37 °C durante 2 horas antes de la estimulación con VEGF (100 ng/ml). La formación de tubos se detectó mediante microscopio de contraste de fase (microscopio Nikon Eclipse TE 300) después de 24 horas de incubación. Para análisis cuantitativo de la formación y longitud de los tubos y para la determinación de la expresión de CD144 a las 48 horas, se fotografiaron *n* = 3 tres campos de microscopia seleccionados al azar por cada condición experimental. Se adquirieron imágenes como se ha descrito anteriormente y se analizó la formación de tubos usando software Image J disponible en el sitio web de los Institutos Nacionales de Salud como se ha descrito anteriormente²⁴. Para la cuantificación de la expresión de CD144, las células positivas se contaron usando el software Neurolucida 8.10 (MBF Bioscience, Williston, VT). Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de pruebas post hoc de Bonferroni. Las diferencias con valores de *P* < 0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

Ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y miogénica *in vitro*. Para ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y miogénica se sembraron células de melanoma purificadas ABCB5⁺ y ABCB5⁻ G3361 por

triplicado a 3×10^3 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos. La diferenciación adipogénica y osteogénica se evaluó usando equipos de diferenciación disponibles en el mercado y tinción con Oil Red O y rojo de alizarina, respectivamente, según las instrucciones del fabricante (Chemicon International, Temecula, CA). Se realizaron ensayos de diferenciación miogénica como se ha descrito anteriormente¹⁰. En resumen, se incubaron subpoblaciones de melanoma en medio de cultivo que consistía en DMEM con glucosa al 4 %, suero bovino fetal al 20 % (vol/vol), penicilina-estreptomina al 1 % (vol/vol) (10.000 UI/ml-10.000 µg/ml, Invitrogen) durante 10 días. El medio se intercambiaba cada 2 días. El día 14, las células se fijaron en metanol helado durante 3 minutos en hielo y se incubaron con Ab monoclonal de ratón anti-miogenina diluido 1:50 (Dako, Carpintería, CA) durante una noche a 4 °C. Después las placas se lavaron, se incubaron con Ab secundario de cabra anti-ratón conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluido 1:100) y después se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector) complementado con DAPI 100 ng/ml para visualizar los núcleos. Los portaobjetos se visualizaron con el objetivo 20X y 40X en un microscopio Nikon Eclipse TE2000-S, se fotografiaron usando la cámara deslizante Spot 7.4 y las imágenes se procesaron usando software Spot versión 4.0.9. (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). Para cuantificación de la expresión del marcador de diferenciación, las células positivas se contaron manualmente y se determinaron las diferencias estadísticas entre los niveles de expresión de los marcadores usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Un valor de P bilateral de $P < 0,05$ se consideró significativo.

Doble marcaje de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Se usaron los siguientes Ab primarios: de rata anti-laminina B2, (Abcam, Cambridge, MA), de conejo anti-CD 144, (Cell Signaling, Beverly, MA), de cabra anti-Tie-1, (Neuromics, Edina, MN) y de ratón anti-ABCBS^{3,5,23}. Los Ab irrelevantes de isotipo coincidente actuaron como control negativo. Los Ab secundarios fueron de caballo anti-IgG de ratón-HRP, de caballo anti-IgG de cabra-HRP, de cabra anti-IgG de conejo-HRP (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA) y de cabra anti-IgG de rata-HRP (Biolegend, San Diego, CA) y de burro anti-IgG de ratón-AF488, de burro anti-IgG de conejo-AF594 y de burro anti-IgG de cabra-AF594 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó inmunohistoquímica usando el método de peroxidasa de rábano picante de 2 etapas. En resumen, se fijaron secciones de tejido congelado con acetona a -20 °C durante 5 minutos, y después se incubaron con Ab primario a 4 °C durante una noche. Después de retirar por lavado el Ab primario no unido con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las secciones tisulares se incubaron con Ab secundario a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se lavaron con PBS 3x5 minutos. Se detectó la inmunorreactividad usando el sustrato de peroxidasa NovaRed (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA). Para marcaje doble de inmunofluorescencia, se fijaron las secciones tisulares congeladas con acetona a -20 °C durante 5 minutos, y después se incubaron con la mezcla de 2 Ab primarios (por ejemplo, Ab de ABCB5 + Ab de CD144) a 40 °C durante una noche. Después de lavar con PBS, las secciones tisulares se incubaron con la mezcla de 2 Ab secundarios (por ejemplo, de burro anti-IgG de ratón-AF488 + de burro anti-IgG de conejo-AF594) a temperatura ambiente durante 1 hora, después se lavaron con PBS 3x5 minutos y las secciones se montaron a continuación con el reactivo antidescoloración ProLong Gold con DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las secciones se observaron bajo un microscopio de fluorescencia de sistema Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japón). Para inmunohistoquímica de HLA-2A de xenoinjertos de melanoma SK-MEL-5 en piel quimérica de ratón/ser humano, se incubaron secciones congeladas con 5 µg/ml de Ab de ratón anti-HLA-2A humano (BD Pharmingen, San José, CA) a 4 °C durante una noche. Después de retirar por lavado el Ab primario no unido con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se incubaron secciones con Ab de caballo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa 1:200 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a temperatura ambiente durante 30 minutos. El Ab secundario no unido se retiró por lavado con PBS. El color se reveló usando el equipo de sustrato de peroxidasa NovRed (Vector Laboratories) y las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Gill n.º 1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

Hibridación *in situ*. Se prepararon sondas de ARN de la siguiente manera: Se sintetizaron moldes de sondas de ARN obtenidos por PCR introduciendo el promotor T7 en la cadena antisentido y el promotor SP6 en la cadena con sentido. El primer par, AB5T7AS (5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGTCTGGCTTTTTCCCTTCTTGAC-3') (SEQ ID NO: 15) y AB5SP6S (5'-GATTTAGGTGACACTATAGAAATTCAGCTGGACGAATGACCCCA-3') (SEQ ID NO: 16), se usó para generar el molde de ADN para sondas de ARN antisentido y con sentido que abarcaban 200 pares de bases de ADNc de ABCB5 humano. Esta secuencia codifica los aminoácidos de ABCB5 499-564 (GI: 34539755). El de cebadores CD133T7AS (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGCCCCAGGACACAGCATA-3') (SEQ ID NO: 17) y CD133SP6S (5'-GATTTAGGTGACACTATAGAGACCCCAAGACTCCCATAAAGC-3') (SEQ ID NO: 18) se usó para generar el molde de ADN para sondas de ARN antisentido y con sentido que abarcaban 200 pares de bases de ADNc de CD133 humano, en donde esta secuencia codifica los aminoácidos de CD133 42-108 (GI: 5174386). Las especificidades de secuencia para ABCB5 y CD133 se confirmaron usando el programa BLAST de la base de datos de Genbank. Las sondas de ARN se marcaron con digoxigenina (DIG) usando el equipo de marcaje de ARN de DIG (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Para hibridación *in situ*, se hornearon secciones tisulares congeladas 8 µM a 50 °C durante 15 minutos, después se fijaron en paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente (TA) durante 20 minutos. Las secciones se trataron con proteinasa K/PBS 1 µg/ml a 37 °C durante 20 minutos y proteinasa K inactivada con glucina/PBS al 0,2 % a TA durante 5 minutos. Tras los lavados con PBS 2x2 minutos, las secciones tisulares se fijaron en paraformaldehído al 4 % a TA durante 15 minutos, se lavaron con PBS 2x5 minutos y después se trataron con anhídrido acético al 0,25 %/trietanolamina 0,1 M a TA durante 10 minutos. Las secciones tisulares se colocaron en SSC 2x y después se hibridaron con una sonda antisentido o con sentido 500 ng/ml en tampón de hibridación (NaCl 0,3 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, EDTA 5 mM, Denhart 1x, formamida al 50 %, ARNt 100 µg/ml y sulfato de dextrano al 10 %) a 42 °C durante una noche. Las secciones posteriores a la hibridación se trataron con SSC 0,2x a 55 °C durante 2x20 minutos, RNasa A 20 g/ml en NaCl 0,5 M, Tris-HCl

10 mM pH 7,5 a 37 °C durante 30 minutos y SSC 0,2x a 55 °C durante 20 minutos. Las sondas hibridadas se inmunodetectaron usando el equipo de detección DIG (Roche) y el equipo de amplificación de señal Tyramide (TSA) (PerkinElmer, Boston, MA) de la siguiente manera: tampón de bloqueo DIG 1x durante 30 minutos, conjugado de peroxidasa y Ab anti-DIG 1:100 a temperatura ambiente durante 1 hora, DIG lavado 1x 3x5 minutos, Reactivo de TSA 10 minutos a TA, PBS 2x5 minutos, estreptavidina-peroxidasa de rábano picante 1:100 30 minutos a temperatura ambiente, PBS 3x5 minutos. El marcaje se visualizó con sustrato NovaRed (Vector Laboratories).

Animales. Se obtuvieron ratones desnudos BALB/c y ratones NOD/SCID en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se obtuvieron ratones SCID (CB-17) y BALB/c Rag2^{-/-} de Taconic (Germantown, NY). Los animales se alojaron en jaulas de microaislamiento esterilizadas por autoclave y se alimentaron con agua y alimentos esterilizados. Los ratones se mantuvieron de acuerdo con las directrices institucionales del Hospital Infantil de Boston y la Facultad de Medicina de Harvard y se realizaron experimentos según protocolos experimentales aprobados.

15 **Xenotrasplante de melanoma de ser humano a ratón y xenotrasplante de melanoma de piel de ser humano a quimérica de ratón/ser humano.**

Se establecieron xenoinjertos de melanoma de ser humano a ratón mediante inyección subcutánea de células de melanoma humano G3361, A375, SK-MEL-5 o humano procedente del paciente clínico en ratones desnudos BALB/c o NOD/SCID como se ha descrito anteriormente³. Para el xenotrasplante de melanoma de piel de ser humano a quimérico de ratón/ser humano, se obtuvo piel humana dividida procedente de un solo donante de acuerdo con el Comité de Revisión Institucional de Gestión de la Investigación de HealthCare Partners cortando la piel abdominal con un dermatoma de calibre de 0,04 cm (0,016 pulgadas). La piel humana fue posteriormente xenoinjertada en ratones Rag2^{-/-} inmunodeficientes como se ha descrito anteriormente¹³, según un protocolo aprobado por el comité institucional de animales. En resumen, se prepararon dos lechos de injerto circulares, cada uno de 1,5 cm², en dorsos bilaterales de ratones Rag2^{-/-} de 4-8 semanas de edad tratados con antibióticos (1 comprimido de alimento adicional por semana que contiene amoxicilina (3 mg), Flagyl (0,69 mg) y bismuto (0,185 mg)) para prevenir la infección por *Helicobacter pylori*. La piel del donante humano se recortó para ajustarse al lecho y se mantuvo en su sitio con grapas hasta 10 días después de la cirugía. Se microinyectaron células de melanoma no segregadas o A375 empobrecidas en ABCB5⁺, MUM-2B o MUM-2C (2 x 10⁶ en 20 µl de PBS) por vía intradérmica en injertos después de 6 semanas de estabilización. Todos los injertos cutáneos se recogieron en su totalidad 3 semanas después de la inoculación de células tumorales, se fijaron en formalina, se cortaron en serie y se tiñeron con hematoxilina y eosina usando métodos convencionales para el análisis histológico de la formación de tumores. Se evaluaron las secciones que representan el área tumoral transversal máxima y, por tanto, que se aproximan mejor al tamaño de los nódulos tumorales generalmente esféricos u ovoides. El volumen tumoral (VT) se determinó histológicamente y se calculó como se ha descrito³. Se evaluaron las diferencias estadísticamente significativas en la formación de tumores histológicos mediante la prueba exacta de Fisher. Se compararon estadísticamente las diferencias en el volumen tumoral usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, considerándose un valor de P bilateral de P < 0,05 significativo.

40 **Xenoinjertos de melanoma transfectados con proteína verde fluorescente (GFP) estable a quimeras de ser humano-SCID.**

Se obtuvieron vectores lentivíricos recombinantes que albergan ADNc de GFP del Dr. M. Herlyn en el Instituto Wistar y se usaron para infectar células de melanoma A375 humanas mediante transferencia de genes lentivíricos. Dos días después de la infección, las células se seleccionaron con puromicina (1 µg/ml) durante un periodo de 7 días. Se verificó la expresión transgénica mediante microscopia de fluorescencia y citometría de flujo. Se generaron xenoinjertos de melanoma en quimeras de ser humano-SCID según el protocolo descrito anteriormente¹³. Se adquirieron ratones SCID (C.B-17) de entre 4 y 6 semanas de edad de Taconic (Germantown, NY). Los ratones se anestesiaron y prepararon para el trasplante afeitando el pelo de un área de 2 cm² en el torso dorsal seguido de la eliminación de la piel de espesor completo hasta la fascia. Se colocaron injertos de prepucio humano de espesor completo del mismo tamaño sobre los lechos de la herida. Después, los injertos de piel se cubrieron con una gasa saturada de vaselina y se fijaron con tiritas y cintas deportivas 3M. Después de 10 días, se retiraron los apósitos y se permitió que los ratones se recuperaran durante aproximadamente 4-5 semanas antes de la inoculación del melanoma. Se recogieron células de melanoma A375 marcadas con GFP y se suspendieron en PBS a una densidad de 10⁸ células/ml. Se inyectaron 100 µl de cada suspensión celular por vía intradérmica en los injertos de piel humana. Los xenoinjertos tumorales se recogieron después en 3 semanas o cuando el tumor alcanzó 1 cm³ de tamaño y se procesaron para obtener secciones congeladas. Para inmunofluorescencia doble, se fijaron secciones congeladas (5 µm de grosor) de xenoinjertos de melanoma en paraformaldehído al 4 %, se bloquearon con suero de burro y se incubaron secuencialmente con Ab anti-CD 144 (Cell Signaling, Danvers, MA), de burro anti-conejo conjugado con Texas red (Invitrogen, Carlsbad, CA), anti-GFP (Novus Biologicals, Littleton, CO) y de burro anti-cabra conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Después de lavar en PBS, las secciones se cubrieron con un cubreobjetos usando un líquido de montaje antidesactivación que contenía DAPI (VectaShield, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se incluyeron Ab primarios de isotipos coincidentes irrelevantes como controles.

Ejemplo 2

Los mecanismos a través de los que MMIC ABCB5⁺ o CSC en otros cánceres desencadenan y promueven la progresión neoplásica son actualmente desconocidos. Los inventores plantearon la hipótesis de que MMIC ABCB5⁺ poseen plasticidad de diferenciación vasculogénica e impulsan selectivamente el crecimiento del melanoma a través de una función específica para proporcionar apoyo nutricional a los tumores en crecimiento en función de la coexpresión preferente *in vivo* de los marcadores de diferenciación vasculogénica CD144 (VE-cadherina) y TIE-1³ por la población minoritaria tumorigénica ABCB5⁺.

Para caracterizar adicionalmente el repertorio de genes expresados diferencialmente en MMIC en comparación con poblaciones generales de tumores, se realizó en primer lugar análisis de micromatrices en subconjuntos de células purificadas ABCB5⁺ ($n = 5$) y ABCB5⁻ ($n = 5$) procedentes de las líneas celulares de melanoma humano establecidas G3361 y A375 y de tres muestras de melanoma procedentes del paciente separadas, todos previamente caracterizados en el laboratorio de los inventores con respecto a la expresión de ABCB5 y el fenotipo de MMIC en ensayos de xenotrasplantes de melanoma humano³. Usando este enfoque¹⁰, se identificaron 399 genes que se expresaban diferencialmente ($P < 0,05$) entre MMIC ABCB5⁺ y poblaciones generales de melanoma ABCB5⁻ (tabla 5), además de ABCB5 que mostró sobreexpresión en poblaciones purificadas ABCB5⁺ por PCR en tiempo real ($P < 0,05$). Una red génica funcional identificada, validada por análisis de expresión génica basados en PCR en subconjuntos de células de melanoma ABCB5⁺, mostró que moléculas clave de la vasculogénesis (la capacidad de diferenciarse a lo largo de las líneas endoteliales), FLT1 (VEGFR-1) y PTK2 (FAK), y de la angiogénesis (la capacidad de inducir crecimiento y proliferación de vasos sanguíneos estromales maduros), FLT1 (VEGFR-1), PTK2 (FAK), MET (HGFR), NRP2 y ETS1, estaban sobreexpresadas específicamente en MMIC ABCB5⁺ (fig. 1a, b).

Se identificó otro conjunto de genes expresados diferencialmente en células madre de melanoma ABCB⁺ frente a células de población general de melanoma ABCB5 usando RT-PCR. Los datos se muestran en la tabla 6. Los niveles de factor de expresión se muestran en la 7^a columna y se pueden comparar con los valores de control mostrados en las últimas filas de la tabla. Un valor positivo indica que el gen tenía niveles de expresión mayores en células ABCB5⁺ y un valor negativo indica que el gen tenía niveles de expresión mayores en células ABCB5. Algunos de los genes presentaron un aumento de expresión mayor de 100 veces y algunos incluso mayores de 1000 veces en células ABCB5⁺ frente a ABCB5⁻. Los genes de alta expresión incluyen factores que probablemente son secretados por las células madre que pueden actuar sobre las células de un tumor, ya sea de manera autocrina en células madre tumorales o de manera paracrina también en células cancerosas de la población general. Se pueden diseñar terapias adecuadas para tratar cánceres al inhibir la expresión o actividad de dichos factores.

También se demostró la expresión preferente de VEGFR-1 por subpoblaciones de MMIC ABCB5⁺ frente a ABCB5⁻ mediante citometría de flujo de color doble al nivel de proteínas ($15,6 \pm 5,3$ % frente a $4,4 \pm 2,0$ % de células, respectivamente, media \pm e.t.m., $n = 6$, $P < 0,05$) (fig. 1c). Para determinar si la interacción VEGF/VEGFR-1 en MMIC influyó en la expresión del marcador de diferenciación vasculogénica CD 144, se evaluaron funcionalmente los efectos de la señalización de VEGF en subpoblaciones de melanoma MMIC purificadas ABCB5⁺ o ABCB5⁻. VEGF (100 ng/ml^{11}) indujo selectivamente la expresión de CD144 a altos niveles en células de melanoma ABCB5⁺ que expresaban VEGFR-1 pero no ABCB5⁻ negativas para VEGFR-1, a $36,2 \pm 5,7$ % frente a $4,8 \pm 2,7$ % de las células (media \pm e.t.m., $n = 3$), respectivamente ($P < 0,01$) (fig. 1d). La preincubación con un anticuerpo monoclonal de bloqueo (mAb) contra VEGFR-1 anuló la capacidad de VEGF para inducir la expresión de CD144 en células de melanoma humano ($0,0 \pm 0,0$ % en cultivos tratados con mAb de VEGFR-1 frente a 64 ± 1 % o 57 ± 3 % en no tratados o tratados con mAb de control de isotipo, respectivamente, media \pm e.t.m., $n = 3$, $P < 0,01$) (fig. 1e). Por otra parte, El mAb de VEGFR-1 inhibió fuertemente la formación de tubos de tipo capilar multicelulares inducidos por VEGF por células de melanoma humano en ensayos de diferenciación vasculogénica *in vitro*¹¹ establecidos, con un número significativamente reducido de tubos formados/campo de microscopía ($6,7 \pm 0,9$ en cultivos tratados con mAb de VEGFR-1 frente a $99,0 \pm 24,0$ o $76,7 \pm 3,3$ % en no tratados o tratados con mAb de control de isotipo, respectivamente, media \pm e.t.m., $n = 3$, $P < 0,05$) y una longitud de tubo promedio significativamente menor ($33,2 \pm 4,5 \mu\text{m}$ en cultivos tratados con mAb de VEGFR-1 frente a $92,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$ u $86,5 \pm 1,7 \mu\text{m}$ en no tratados o tratados con mAb de control de isotipo, respectivamente, media \pm e.t.m., $n = 3$, $P < 0,001$) (fig. 1f). Por el contrario, tanto MMIC ABCB5⁺ como la población general de melanoma ABCB5⁻ presentaron una capacidad de diferenciación adipogénica y osteogénica similar detectada previamente en células de melanoma humano¹² (adipogénesis: $100,0 \pm 0,0$ % frente a $93,2 \pm 6,9$ % de células positivas para Oil Red, respectivamente; media \pm e.t.m., $n = 3$, NS; osteogénesis: $90,8 \pm 9,2$ % frente a $98,3 \pm 1,7$ % de células positivas para rojo de alizarina, respectivamente; media \pm e.t.m., $n = 3$, NS) (fig. 1 g, h) y ni MMIC ABCB5⁺ ni la población general de melanoma ABCB5⁻ presentaron capacidad de diferenciación miogénica¹⁰ ($0,0 \pm 0,0$ % frente a $0,0 \pm 0,0$ % de células positivas para miogenina, respectivamente; media \pm e.t.m., $n = 3$, NS) (fig. 1h). La capacidad de diferenciación vasculogénica *in vitro* selectiva de MMIC ABCB5⁺ en respuesta a la señalización de VEGF/VEGFR-1 indicó una posible función de este subconjunto de CSC en la vasculogénesis tumoral.

Tabla 5: Genes expresados diferencialmente entre MMIC ABCB5⁺ y poblaciones generales de melanoma ABCB5⁻ ($P < 0,05$).

Moléculas	ID	Factor de cambio
AABHD7	239579_at	0,661
ACBD6	225317_at	0,83
AK3	224655_at	0,845
AKAP9	215483_at	2,168
AKR1CL2	1559982_s_at	1,732
AMZ2	227567_at	1,377
ANAPC5	235926_at	2,631
ANK2	202921_s_at	4,162
ANKH	229176_at	0,776
ANKRD28	241063_at	2,297
ANKRD44	226641_at	1,218
ANKRD52	228257_at	0,762
ANXA4	201302_at	0,83
AOC3	204894_s_at	1,894
APBB2	40148_at	1,139
ARS2	201679_at	1,307
ASCC3L1 (incluye EG:23020)	214982_at	3,009
ASPM	232238_at	1,411
ATAD2	235266_at	1,304
ATP5I	207335_x_at	0,737
ATXN2L	207798_s_at	1,656
BARD1	205345_at	1,559
BAT3	230513_at	0,697
BCL9L	227616_at	1,291
BDP1	224227_s_at	1,632
BLID	239672_at	1,91
BRI3	223376_s_at	0,792
BUB1 (incluye EG:699)	216277_at	1,856
BUB1 (incluye EG:699)	233445_at	3,209
C10ORF18	244165_at	2,046
C12ORF45	226349_at	0,688
C12ORF48	220060_s_at	1,216
C12ORF51	230216_at	2,874
C12ORF51	1557529_at	3,632
C14ORF135	1563259_at	1,353

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
C14ORF156	221434_s_at	0,867
C16ORF63	225087_at	0,872
C18ORF10	213617_s_at	0,754
C18ORF10	212055_at	0,737
C19ORF42	219097_x_at	0,813
C20ORF4	234654_at	1,731
C22ORF28	200042_at	0,829
C22ORF30	216555_at	1,521
C2ORF30	224630_at	0,851
CSORF24	229098_s_at	1,531
C9ORF78	218116_at	0,789
C9ORF85	244160_at	1,52
CABIN1	1557581_x_at	3,052
CAMK2D	225019_at	0,823
CAMK2D	228555_at	0,758
CANX	238034_at	0,8
CAPZB	201949_x_at	0,764
CASC5	228323_at	1,144
CBS	240517_at	1,818
CCDC127	226515_at	0,835
CCDC14	240884_at	1,771
CCDC52	234995_at	1,166
CCDC57	214818_at	1,703
CCDC73	239848_at	1,294
CCDC93	219774_at	1,208
CDC14B	234605_at	2,512
CDC16	242359_at	6,261
CENPJ	234023_s_at	1,22
CENPJ	220885_s_at	1,64
CEP27	228744_at	0,651
CEP55	218542_at	1,096
CGGBP1	224600_at	0,913
CHD2	244443_at	1,757
CHD8	212571_at	1,27
CLN8	229958_at	1,344
CNIH3	232758_s_at	1,451

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
COBRA1	1556434_at	1,985
COIL	203653_s_at	1,259
COL4A2	211966_at	0,729
COQ4	218328_at	1,328
CPEB2	226939_at	1,251
CPNE3	202119_s_at	0,833
CREB1	204313_s_at	0,791
CREB3L2	237952_at	2,013
CRIPAK	228318_s_at	1,486
CROP	242389_at	2,121
CSE1L	201112_s_at	0,911
CSE1L	210766_s_at	0,885
CUL4A	232466_at	2,607
CYB5R3	1554574_a_at	0,793
DARS	201624_at	0,928
DCLRE1C	242927_at	1,187
DCUN1D2	240478_at	1,76
DDX17	213998_s_at	1,528
DDX52	212834_at	0,771
DEGS1	209250_at	0,804
DEPDC1	232278_s_at	1,119
DHX40	218277_s_at	0,812
DNAJC21	230893_at	0,829
DNM1L	236032_at	1,503
DTX3	49051_g_at	1,32
ECHDC1	233124_s_at	0,943
EIF2S1	201142_at	0,717
EIF2S1	201144_s_at	0,824
EIF4G3	201935_s_at	1,174
ELOVL2	213712_at	0,699
EMP2	225079_at	0,781
ENAH	222433_at	0,783
ENDOD1	212573_at	0,775
ENTPD5	231676_s_at	0,867
ERBB3	1563253_s_at	0,691
ERRFI1	224657_at	0,881

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
ETS1	241435_at	1,797
EWSR1	229966_at	1,686
EXT1	242126_at	2,116
FAM62C	239770_at	1,551
FAM98A	212333_at	0,767
FHL3	218818_at	0,546
FLJ10357	241627_x_at	2,31
FLJ31306	239432_at	1,753
FLT1	232809_s_at	1,861
FOXN3	218031_s_at	0,721
FUBP1	240307_at	2,087
GABARAPL2	209046_s_at	0,863
GABPA	243498_at	2,03
GALNT1	201722_s_at	0,926
GBF1	233114_at	2,03
GGT1	211417_x_at	1,555
GHITM	1554510_s_at	0,764
GMFB	202544_at	0,904
GNPDA1	202382_s_at	0,787
GOLGA8A	213650_at	2,289
GPD2	243598_at	2,13
GPR107	211979_at	0,843
GPR135	241085_at	1,851
HDAC3	240482_at	2,062
HEATR2	241352_at	0,784
HECW1	237295_at	11,843
HELLS	242890_at	1,359
HERC5	219863_at	1,156
HIAT1	225222_at	0,832
HNRNPC	235500_at	1,769
HNRPD	235999_at	1,92
HNRPD	241702_at	1,962
HNRPH1	213472_at	2,332
HOXA2	228642_at	1,44
HOXB9	216417_x_at	0,766
HOXD3	206601_s_at	1,897

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
HPS1	239382_at	1,749
HSD17B1	228595_at	0,753
HSDL2	209513_s_at	0,803
HSPA4L	205543_at	0,786
HUWE1	214673_s_at	1,858
IDS	1559136_s_at	2,001
IFNGR1	242903_at	2,171
IGHMBP2	215980_s_at	0,893
IL13RA1	201887_at	0,775
INSIG2	209566_at	0,872
IPO7	200993_at	0,875
IPW	213447_at	1,399
IRS2	236338_at	2,162
JARID1A	226367_at	1,192
JARID2	232835_at	2,139
KIAA0841	36888_at	1,389
KIAA0907	230028_at	1,83
KIAA1267	224489_at	1,355
KIAA1618	231956_at	2,27
KIAA1737	225623_at	0,837
KIAA2013	1555933_at	2,18
KIDINS220	1557246_at	2,97
KPNA6	226976_at	0,814
KRTAP19-1	1556410_a_at	2,07
KSR2	230551_at	3,211
LBA1	213261_at	1,225
LIMS1	212687_at	0,822
LOC126917	225615_at	0,819
LOC137886	212934_at	0,886
LOC145757	1558649_at	2,779
LOC145786	229178_at	1,907
LOC146325	1553826_a_at	3,943
LOC203547	225556_at	0,802
LOC219731	1557208_at	0,419
LOC254128	1557059_at	2,164
LOC283888	1559443_s_at	2,56

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
LOC285147	236166_at	2,377
LOC338799	226369_at	1,137
LOC388135	230475_at	1,979
LOC388969	232145_at	1,555
LOC389203	225014_at	0,79
LOC641298	208118_x_at	1,419
LOC645166	228158_at	0,823
LOC645513	239556_at	2,24
LOC729397	236899_at	2,231
LRCH3	229387_at	1,793
LRRFIP1	239379_at	1,796
MAEA	207922_s_at	0,765
MALAT1	224568_x_at	1,699
MALAT1	223940_x_at	1,659
MAP1LC3B	208785_s_at	0,808
MAP2K4	203266_s_at	0,881
MAP3K15	200979_at	0,741
6-Mar	201737_s_at	1,219
MBNL1	201152_s_at	0,867
MDM4	235589_s_at	1,629
MECR	218664_at	0,832
MED19	226300_at	0,782
MEF2C	236395_at	2,104
MET	213816_s_at	1,283
MIA3	1569057_s_at	0,759
MLL	212079_s_at	1,599
MOBKL1B	214812_s_at	0,762
MRPL42 (incluye EG:28977)	217919_s_at	0,866
MRPL51	224334_s_at	0,846
MTERFD3	225341_at	1,422
MTUS1	239576_at	1,975
MYO10	243159_x_at	2,528
MYO10	244350_at	1,677
N4BP2L1	213375_s_at	2,01
N4BP2L2	235547_at	1,631
N4BP2L2	242576_x_at	2,349

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
NAALAD2	1554506_x_at	0,464
NANP	228073_at	0,817
NAPA	239362_at	1,624
NAPE-PLD	242635_s_at	1,216
NARG1	1556381_at	2,827
NAT8B	206964_at	2,513
NBPF16	201104_x_at	1,411
NBR1	1568856_at	1,957
NCKAP1L	209734_at	2,071
NDFIP1	217800_s_at	0,815
NDUFAF2	228355_s_at	0,722
NDUFB6	203613_s_at	0,712
NEK1	213328_at	1,381
NFATC2IP	217527_s_at	1,272
NPAS2	1557690_x_at	1,76
NPTN	228723_at	2,086
NRP2	210841_s_at	1,106
NUCB2	203675_at	0,812
NUDT4	212183_at	0,685
NUPL1	241425_at	2,179
OCIAD1	235537_at	1,794
ORMDL1	223187_s_at	1,171
OSBPL5	233734_s_at	1,261
OSGEP	242930_at	1,541
PABPN1	213046_at	2,228
PAK1	226507_at	0,869
PAPD4	222282_at	3,39
PDE4B	215671_at	3,457
PDHB	211023_at	0,827
PDHB	208911_s_at	0,807
PDK1	239798_at	1,654
PDLIM5	212412_at	0,752
PDSS1	236298_at	1,64
PDXDC1	1560014_s_at	2,105
PGRMC2	213227_at	0,686
PHC1	218338_at	1,123

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
PHF20L1	219606_at	2,3
PIGY (incluye EG:84992)	224660_at	0,793
PIP5K3	1557719_at	2,227
PITPNA	201190_s_at	0,863
PMP22	210139_s_at	0,865
PMS2L3	214473_x_at	1,159
POFUT2	207448_at	1,759
POLR2J2	1552622_s_at	1,828
POLR2J2	1552621_at	1,652
POP4	202868_s_at	0,847
PPP1R3D	204554_at	0,805
PPP1R7	201213_at	0,698
PPP3CA	202457_s_at	0,867
PRO1073	228582_x_at	1,607
PRPF38B	230270_at	1,888
PSEN1	242875_at	1,851
PSMA2	201316_at	0,839
PSMA3	201532_at	0,798
PTK2	234211_at	2,539
PTPMT1	229535_at	0,769
RAB11FIP3	228613_at	2,546
RAB11FIP3	216043_x_at	0,551
RAB14	200927_s_at	0,772
RAB1A	213440_at	0,81
RAD54L	204558_at	1,483
RADIL	223693_s_at	2,126
RBM25	1557081_at	1,57
RBM26	229433_at	1,43
RBM4	213718_at	1,53
RBM5	209936_at	2,249
RFT1	240281_at	1,426
RHOA	240337_at	2,143
RHOBTB2	1556645_s_at	1,538
RLBP1L1	224996_at	0,835
RNF43	228826_at	1,401
RP11-139H14.4	1569124_at	11,472

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
RPE	221770_at	0,766
RPE	225039_at	0,787
RPL7L1	225515_s_at	0,899
RUNX3	204198_s_at	1,233
SDAD1	242190_at	3,009
SDCCAG8	243963_at	2,67
SEC16B	1552880_at	1,877
SEPHS1	208940_at	0,875
11-Sep	201307_at	0,784
SF1	210172_at	2,452
SF3B1	201070_x_at	1,35
SF3B1	214305_s_at	1,359
SFRS15	222311_s_at	1,818
SFRS15	243759_at	2,028
SGCA	1562729_at	2,395
SGOL2	235425_at	1,591
SH2B3	203320_at	0,806
SKP1	200718_s_at	0,898
SLC16A1	202235_at	0,83
SLC20A1	230494_at	1,884
SLC2A11	232167_at	1,529
SLC2A8	239426_at	2,012
SLC30A9	237051_at	2,063
SMA4	238446_at	2,035
SMC6	218781_at	1,203
SMYD2	212922_s_at	0,867
SNORA28	241843_at	1,628
SNRPA1	242146_at	3,54
SON	201085_s_at	1,144
SPOPL	225659_at	0,828
SQLE	213577_at	1,502
SRP72	208801_at	0,751
SRP72	208803_s_at	0,766
SRPRB	218140_x_at	0,767
STK36	234005_x_at	1,335
STK36	231806_s_at	1,362

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
STRAP	1558002_at	2,189
STX11	235670_at	0,778
STX8	204690_at	0,819
SUPT7L	201838_s_at	0,865
SVIL	215279_at	2,228
SYNE2	202761_s_at	1,356
TAF15	227891_s_at	1,971
TAF1B	239046_at	1,468
TAOK3	220761_s_at	1,195
TBC1D5	201814_at	0,782
TBC1D8	221592_at	1,246
TBC1D8	204526_s_at	1,373
TBXA2R	207554_x_at	0,877
TBXA2R	336 at	0,73
TCAG7.907	238678_at	1,546
TCOF1 (incluye EG:6949)	202385_s_at	1,169
TFB1M	228075_x_at	0,87
THRAP3	217847_s_at	1,464
TIMM23	218119 at	0,723
TM6SF1	1558102_at	0,704
TMEM126B	221622_s_at	0,843
TMEM165	1560622_at	1,756
TMEM30A	232591_s_at	0,771
TNFAIP1	201207_at	0,88
TNPO1	1556116_s_at	1,739
TNRC6A	234734_s_at	1,268
TOX4	201685_s_at	0,73
TPM4	235094_at	2,079
TRAPPC2	219351_at	0,821
TRAPPC2L	218354_at	0,837
TRIM33	239716_at	2,496
TRIM46	238147_at	1,96
TRIO	240773_at	2,607
TRNT1	243236_at	2,295
TRPV1	1556229_at	2,636
TSPAN31	203227_s_at	0,744

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
TTC26	233999_s_at	1,184
TTC3	208664_s_at	1,396
TTC9C	1569189_at	1,55
TTLL4	1557611_at	2,092
TXNDC12	223017_at	0,849
TXNL1	243664_at	1,98
UBE2E3	210024_s_at	0,758
UBE3C	1560739_a_at	0,815
UBXD7	212840_at	0,754
UGT1A6	206094_x_at	3,86
UNK	1562434_at	1,637
UQCC	229672_at	1,451
USP36	224979_s_at	1,393
USP8	229501_s_at	0,808
VPS37B	236889_at	2,85
VTI1B	209452_s_at	0,821
WDR41	218055_s_at	0,789
WDR68	233782_at	1,924
WFS1	1555270_a_at	1,315
WIPF2	216006_at	2,916
WTAP	1560274_at	1,747
XRCC5	232633_at	2,106
YY1	224711_at	0,821
ZFHX3	215828_at	1,737
ZFR	238970_at	2,655
ZFX	207920_x_at	1,625
ZMYND8	209049_s_at	1,102
ZNF154	242170_at	2,667
ZNF224	216983_s_at	2,986
ZNF226	219603_s_at	1,332
ZNF251	226754_at	1,313
ZNF292	236435_at	3,201
ZNF326	241720_at	1,418
ZNF337	1565614_at	2,096
ZNF536	233890_at	3,303
ZNF567	242429_at	2,103

ES 2 796 111 T3

(continuación)

Moléculas	ID	Factor de cambio
ZNF618	226590_at	0,75
ZNF668	219047_s_at	0,691
ZNF800	227101_at	1,484
ZUFSP	228330_at	1,205

Tabla 6: Genes expresados diferencialmente entre células ABCB5⁺ y ABCB5⁻ detectadas mediante RT-PCR. N.º de catálogo de matrices de PCR: PAHS-024

Posición	Unigene	Refseq	Símbolo	Descripción	NombreG	Factor de cambio de ABCB5 ⁺ /ABCB5 ⁻
A01	Hs.525622	NM_005163	AKT1	homólogo del oncogén vírico de timoma murino V-akt 1	AKT/PKB	1,2687
A02	Hs.369675	NM_001146	ANGPT1	Angiopoyetina 1	AGP1/AGPT	1,2953
A03	Hs.583870	NM_001147	ANGPT2	Angiopoyetina 2	AGPT2/ANG2	2,7007
A04	Hs.209153	NM_014495	ANGPTL3	Tipo angiopoyetina 3	ANGPT5	3,0596
A05	Hs.9613	NM_001039 667	ANGPTL4	Tipo angiopoyetina 4	ANGPTL2/ARP4	1,6974
A06	Hs.1239	NM_001150	ANPEP	Alanil aminopeptidasa (de membrana) (aminopeptidasa N, aminopeptidasa M, aminopeptidasa microsómica, CD13, p150)	APN/CD13	1,3597
A07	Hs.194654	NM_001702	BAI1	Inhibidor de la angiogénesis específica del cerebro 1	FLJ41988	3,0596
A08	Hs.54460	NM_002986	CCL11	Ligando 11 de quimiocina (motivo C-C)	SCYA11	1,8834
A09	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Ligando 2 de quimiocina (motivo C-C)	GDCF-2/GDCF-2 HC11	2,0326
A10	Hs.76206	NM_001795	CDH5	Cadherina 5, tipo 2, VE-cadherina (epitelio vascular)	7B4/CD144	3,0596
A11	Hs.517356	NM_030582	COL18A1	Colágeno, tipo XVIII, alfa 1	KNO	1,9634
A12	Hs.570065	NM_000091	COL4A3	Colágeno, tipo IV, alfa 3 (antígeno de Goodpasture)	TUMSTATINA	2,1634
B01	Hs.789	NM_001511	CXCL1	Ligando de quimiocina (motivo CXC) 1 (actividad estimulante del crecimiento del melanoma, alfa)	FSP/GR01	1,2086
B02	Hs.632586	NM_001565	CXCL10	Ligando 10 de quimiocina (motivo C-X-C)	C7/IF110	-2,1987
B03	Hs.89690	NM_002090	CXCL3	Ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	CINC-2b/GR03	2,061
B04	Hs.89714	NM_002994	CXCL5	Ligando 5 de quimiocina (motivo C-X-C)	ENA-78/SCYB5	1,8834
B05	Hs.164021	NM_002993	CXCL6	Ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína quimiotáctica de granulocitos 2)	CKA-3/GCP-2	2,1936
B06	Hs.77367	NM_002416	CXCL9	Ligando 9 de quimiocina (motivo C-X-C)	CMK/Humig	-1,1225
B07	Hs.592212	NM_001953	TYMP	Timidina fosforilasa	ECGF1/MNGIE	1,5837
B08	Hs.154210	NM_001400	EDG1	Receptor acoplado a proteína G de esfingolipidos, de diferenciación endotelial, 1	CHEDG1/D1S3362	1,0377
B09	Hs.516664	NM_182685	EFNA1	Efrina-A1	B61/ECKLG	1,4573
B10	Hs.516656	NM_004952	EFNA3	Efrina-A3	EFL2/EPLG3	1,3692
B11	Hs.149239	NM_004093	EFNB2	Efrina-B2	EPLG5/HTKL	1,1355
B12	Hs.419815	NM_001963	EGF	Factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)	HOMG4/JURG	187,8365
C01	Hs.76753	NM_000118	ENG	Endoglina (síndrome de Osler-Rendu-Weber 1)	CD105/END	1,1514

(continuación)

Posición	Unigene	Refseq	Símbolo	Descripción	NombreG	Factor de cambio de ABCB5*/ABCB5-
C02	Hs.437008	NM_004444	EPHB4	Receptor de EPH B4	HTK/MYK1	1,3692
C03	Hs.115263	NM_001432	EREG	Epirregulina	ER	1,8834
C04	Hs.483635	NM_000800	FGF1	Factor de crecimiento de fibroblastos 1 (ácido)	AFGF/ECGF	1,5511
C05	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (básico)	BFGF/FGFB	1,1355
C06	Hs.1420	NM_000142	FGFR3	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (acondroplasia, enanismo tanatofórico)	ACH/CD333	1,7092
C07	Hs.11392	NM_004469	FIGF	Factor de crecimiento inducido por C-fos (factor de crecimiento endotelial vascular D)	VEGF-D/VEGFD	3,5884
C08	Hs.654360	NM_002019	FLT1	Tirosina cinasa 1 relacionada con Fms (factor de crecimiento endotelial vascular/receptor del factor de permeabilidad vascular)	FLT/VEGFR1	2,4172
C09	Hs.388245	NM_021973	HAND2	Derivados de corazón y cresta neural expresados 2	DHAND2/Hed	2,0186
C10	Hs.396530	NM_000601	HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (hepapatetina A; factor de dispersión)	F-TCF/HGFB	4,542
C11	Hs.654600	NM_001530	HIF1A	Factor inducible por hipoxia 1, subunidad alfa (factor de transcripción básico de hélice-bucle-hélice)	HIF-1alfa/HIF1	-1,0918
C12	Hs.44227	NM_006665	HPSE	Heparanasa	HPA/HPR1	286,6871
D01	Hs.504609	NM_002165	ID1	Inhibidor 1 de unión a ADN, proteína de hélice-bucle-hélice negativa dominante	ID	-1,0329
D02	Hs.76884	NM_002167	ID3	Inhibidor 3 de unión a ADN, proteína de hélice-bucle-hélice negativa dominante	HEIR-1	-1,3535
D03	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Interferón, alfa 1	IFL/IFN	1,8834
D04	Hs.93177	NM_002176	IFNB1	Interferón, beta 1, fibroblasto	IFB/IFF	1,8834
D05	Hs.856	NM_000619	IFNG	Interferón, gamma	IFG/IFI	1,8834
D06	Hs.160562	NM_000618	IGF1	Factor de crecimiento insulínico 1 (somatomedina C)	IGFI	4,7022
D07	Hs.126256	NM_000576	IL1B	Interleucina 1, beta	IL-1/IL1-BETA	2,0898
D08	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleucina 6 (interferón, beta 2)	BSF2/HGF	1,7331
D09	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleucina 8	3-10C/AMCF-I	1,1674
D10	Hs.436873	NM_002210	ITGAV	Integrina, alfa V (receptor de vitronectina, polipéptido alfa, antígeno CD51)	CD51/DKFZ_p686A08142	1,217
D11	Hs.218040	NM_000212	ITGB3	Integrina, beta 3 (glucoproteína plaquetaria IIa, antígeno CD61)	CD61/GP3A	-1,0619
D12	Hs.224012	NM_000214	JAG1	Jagged 1 (síndrome de Alagille)	AGS/AHD	1566,5046

(continuación)

Posición	Unigene	Refseq	Símbolo	Descripción	NombreG	Factor de cambio de ABCB5*/ABCB5-
E01	Hs.479756	NM_002253	KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (una tirosina cinasa receptora de tipo III)	CD309/FLK1	1,234
E02	Hs.473256	NM_005560	LAMA5	Laminina, alfa 5	KIAA1907	3,8727
E03	Hs.421391	NM_007015	LECT1	Quimiotaxina 1 derivada de células leucocitarias	BRICD3/CHM-1	1,8834
E04	Hs.194236	NM_000230	LEP	Leptina	OB/OBS	2,1485
E05	Hs.82045	NM_002391	MDK	Midkina (factor 2 estimulante del crecimiento de neuritas)	MK/NEGF2	1,4573
E06	Hs.513617	NM_004530	MMP2	Metalopeptidasa 2 de matriz (gelatinasa A, gelatinasa de 72 kDa, colagenasa de tipo IV de 72 kDa)	CLG4/CLG4A	1,674
E07	Hs.297413	NM_004994	MMP9	Metalopeptidasa 9 de matriz (gelatinasa B, gelatinasa de 92 kDa, colagenasa de tipo IV de 92 kDa)	CLG4B/GELB	1,9097
E08	Hs.436100	NM_004557	NOTCH4	Homólogo de Notch 4 (<i>Drosophila</i>)	INT3/NOTCH3	1,2002
E09	Hs.131704	NM_003873	NRP1	Neuropilina 1	CD304/DKFZp686A03134	1,1755
E10	Hs.471200	NM_003872	NRP2	Neuropilina 2	NP2/NPN2	1,4373
E11	Hs.707991	NM_002607	PDGFA	Polipéptido del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa	PDGF-A/PDGF1	1,2002
E12	Hs.514412	NM_000442	PECAM1	Molécula de adhesión a plaquetas/células endoteliales (antígeno CD31)	CD31/PECA M-1	11,9037
F01	Hs.81564	NM_002619	PF4	Factor plaquetario 4 (ligando 4 de quimiocina (motivo C-X-C))	CXCL4/SCY B4	2,9966
F02	Hs.252820	NM_002632	PGF	Factor de crecimiento placentario, proteína relacionada con el factor de crecimiento endotelial vascular	D12S1900/PGFL	-1,1865
F03	Hs.77274	NM_002658	PLAU	Activador de plasminógeno, urocina	ATF/UPA	1,6396
F04	Hs.143436	NM_000301	PLG	Plasminógeno	DKFZp779M0222	1,8834
F05	Hs.125036	NM_020405	PLXDC1	Que contiene dominio de plexina 1	DKFZp686F0937/TEM3	3,4184
F06	Hs.528665	NM_021935	PROK2	Procinetina 2	BV8/KAL4	1,8446
F07	Hs.201978	NM_000962	PTGS1	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 1 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa)	COX1/COX3	1,2086
F08	Hs.532768	NM_002615	SERPINF1	Inhibidor de serpina peptidasa, clado F (antiplasmina alfa-2, factor derivado del epitelio pigmentario), miembro 1	EPC-1/PEDF	1,1121
F09	Hs.68061	NM_021972	SPHK1	Esfingosina cinasa 1	SPHK	1,192
F11	Hs.89640	NM_000459	TEK	TEKtirocina cinasa, endotelial (malformaciones venosas, múltiples cutáneas y mucosas)	CD202B/TIE-2	-1,2805

(continuación)

Posición	Unigene	Refseq	Símbolo	Descripción	NombreG	Factor de cambio de ABCB5*/ABCB5-
F12	Hs.170009	NM_003236	TGFA	Factor de crecimiento transformante, alfa	TFGA	3549,3357
G01	Hs.645227	NM_000660	TGFB1	Factor de crecimiento transformante, beta 1	CED/DPD1	1,1837
G02	Hs.133379	NM_003238	TGFB2	Factor de crecimiento transformante, beta 2	TGF-beta2	1,3787
G03	Hs.494622	NM_004612	TGFBR1	Factor de crecimiento transformante, receptor beta I (cinasa similar al receptor de activina A de tipo II, 53 kDa)	AAT5/ACVRLK4	1,7695
G04	Hs.164226	NM_003246	THBS1	Trombospondina 1	THBS/TSP	-1,0619
G05	Hs.371147	NM_003247	THBS2	Trombospondina 2	TSP2	-1,203
G06	Hs.522632	NM_003254	TIMP1	TIMP inhibidor 1 de metalopeptidasa	CLGI/EPA	-1,1147
G07	Hs.633514	NM_003255	TIMP2	TIMP inhibidor 2 de metalopeptidasa	CSC-21K	1,2864
G08	Hs.701968	NM_000362	TIMP3	TIMP inhibidor 3 de metalopeptidasa (distrofia del fondo de Sorsby, pseudoinflamatoria)	HSMRK222/K222	1,8834
G09	Hs.241570	NM_000594	TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	DIF/TNF-alfa	4,0652
G10	Hs.525607	NM_006291	TNFAIP2	Proteína 2 inducida por factor de necrosis tumoral, alfa	B94	1,8834
G11	Hs.73793	NM_003376	VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A	VEGF/VEGF-A	2,4509
G12	Hs.435215	NM_005429	VEGFC	Factor de crecimiento endotelial vascular C	Flt4-L/VRP	446,7529
H01	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulina	B2M	-1,2983
H02	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hipopxantina fosforribosil transferasa 1 (síndrome de Lesch-Nyhan)	HGPR/HPRT	-1,2894
H03	Hs.523185	NM_012423	RPL13A	Proteína ribosómica L13a	RPL13A	1,1837
H04	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	G3PD/GAPD	-1,146
H05	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actina, beta	PS1TP5BP1	-1,0329
H06	N/D	SA_00105	HGDC	Contaminación del ADN genómico humano	HIGX1A	1,8834
H07	N/D	SA_00104	RTC	Control de transcripción inversa	RTC	1,7451
H08	N/D	SA_00104	RTC	Control de transcripción inversa	RTC	1,7451
H09	N/D	SA_00104	RTC	Control de transcripción inversa	RTC	1,7695
H10	N/D	SA_00103	PPC	Control positivo de PCR	PPC	1,8067
H11	N/D	SA_00103	PPC	Control positivo de PCR	PPC	1,7818
H12	N/D	SA_00103	PPC	Control positivo de PCR	PPC	36695,9527

Ejemplo 3

Por lo tanto, los inventores probaron la hipótesis de que las MMIC, definidas por el nuevo marcador ABCB5³, se refieren específicamente al fenómeno de la mímica vasculogénica por la que las células de melanoma forman canales capaces de conducir nutrientes de la sangre periférica y, por tanto, actúan como sustitutos de los vasos tumorales maduros⁴. Debido a que los inventores plantean que este fenómeno puede ser más robusto durante las primeras etapas de la formación del tumor antes de que se desarrolle completamente la angiogénesis cancerosa, se evaluaron melanomas procedentes de seres humanos inducidos experimentalmente cultivados como xenoinjertos tumorales en la hipodermis de ratones inmunodeficientes y en la dermis de piel humana xenoinjertada en ratones inmunodeficientes (fig. 2), siendo este último un modelo humanizado por el que se desarrolla melanoma humano en el contexto del microambiente estromal humano¹³. Aunque solo los vasos tumorales periféricos expresaron el marcador endotelial maduro, CD31, más regiones interiores de los melanomas presentaron formación de canales de anastomosis negativos para CD31 con hallazgos histológicos, histoquímicos (PAS-D y reactividad de laminina) y ultraestructurales coherentes con las características establecidas de la mímica vasculogénica⁴ (fig. 2a-d). Mediante microscopía electrónica, los espacios de tipo luz en estas regiones estaban revestidos por material similar a la membrana basal y células de melanoma viables y contenían eritrocitos rodeados por una matriz de gránulos finos compatibles con plasma, lo que sugiere comunicación con la circulación sistémica⁴. Por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, los canales expresaron la proteína y ARNm de ABCB5, respectivamente (fig. 2f-h), que también se correlacionaron *in vitro* cuando se analizaron a través de un panel de líneas celulares de melanoma humano (fig. 4) y la arquitectura de canales ABCB5⁺ en tumores con xenoinjertos era idéntica a la detectada focalmente en melanomas procedentes del paciente (fig. 2f, recuadro). También se observó un patrón idéntico para ARNm de CD133 (no ilustrado), un marcador adicional para células de melanoma tumorigénicas¹⁴ y progresión de melanoma¹⁵. El mAb anti-ABCB5 administrado de manera sistémica *in vivo* se ubicó en canales, confirmando adicionalmente su perfusión sistémica, así como la asociación íntima de células de melanoma ABCB5⁺ con luces de canales (fig. 2i). El doble marcaje demostró la localización conjunta de los marcadores endoteliales humanos CD144 y TIE-1 con células ABCB5⁺ que forman canales (fig. 2j, k). Los tumores iniciados por líneas celulares de melanoma que expresaban el transgén de la proteína verde fluorescente (GFP) confirmaron la presencia de canales con revestimiento de células de melanoma que coexpresaban GFP y CD144 asociados a melanoma (fig. 2e), así como antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I asociados a melanoma humano pero no a xenoinjerto humano (no ilustrado). Estos datos muestran que la formación de canales de tipo vasos perfundidos en el melanoma humano está mediada por la subpoblación de MMIC ABCB5⁺ que se ha descubierto que presenta selectivamente perfiles génicos y capacidad de diferenciación compatible con su participación en la vasculogénesis tumoral.

Ejemplo 4

A continuación, se razonó que si la formación de canales vasculogénicos mediada por MMIC ABCB5⁺ era funcionalmente necesaria para su capacidad para iniciar e impulsar eficazmente el crecimiento del melanoma, el agotamiento de MMIC hasta niveles bajos debería inhibir la respuesta vasculogénica asociada al melanoma. Para evaluar la tumorigénesis y la vasculogénesis en un bioensayo más relevante para el melanoma primario humano, se utilizó de nuevo un modelo de xenoinjerto de piel humana/murino por el que se desarrollan melanomas en el microambiente dérmico relevante de la piel humana y expresan características arquitectónicas y patrones de crecimiento evolutivo más parecidos a las lesiones de origen natural¹³. El trasplante ortotópico intradérmico de 2×10^6 células de melanoma cutáneo A375 no segregadas (positividad para ABCB5: $5,2 \pm 5,1$ %; media \pm e.t.m., $n = 9$) (fig. 3a) o trasplante heterotópico de 2×10^6 células de melanoma uveal no segregadas previamente ensayadas para determinar la diferenciación vasculogénica^{4,16} (MUM-2B y MUM-2C, positividad para ABCB5: $2,46 \pm 0,46$ % y $3,81 \pm 1,04$ %, respectivamente; media \pm e.t.m., $n = 3-4$) (fig. 3a) en la piel humana dio lugar a la formación de tumores tres semanas después de microinyecciones en 14 de 14 receptores de injertos de piel (A375: $n = 6$, MUM-2B: $n = 4$, MUM-2C: $n = 4$ repeticiones) cuando se evalúa histológicamente en secciones en serie de cada xenoinjerto de piel humana en su totalidad (fig. 3b, c). Por el contrario, el trasplante intradérmico de números iguales de células de melanoma con agotamiento de ABCB5⁺ dio lugar a la formación de tumores evaluados histológicamente en solo 6 de 14 receptores de injertos de piel ($P < 0,002$) (fig. 3b, c) y los volúmenes tumorales medios (VT) determinados histológicamente se redujeron significativamente en los receptores de inóculos de melanoma con agotamiento de ABCB5⁺ frente a no segregado (VT = $2,8 \pm 1,8$ mm³ frente a $10,9 \pm 6,9$ mm³, respectivamente; media \pm e.t.m., $P < 0,005$) (fig. 3d). Cuando se evaluó la formación de canales vasculogénicos dentro de los tumores usando tecnología de análisis de imágenes cuantitativa para evaluar la densidad pixelada de la inmunorreactividad de la laminina, se detectaron significativamente menos canales por área de sección transversal en tumores que se formaron a partir de inóculos con agotamiento de MMIC en comparación con los que se originaron a partir de injertos de células tumorales no segregadas (A375, $P < 0,0032$; MUM-2B, $P < 0,0005$; MUM-2C, $P < 0,0059$) (fig. 3e, f). En conjunto, estos hallazgos muestran en modelos de xenoinjerto relevantes del desarrollo temprano del melanoma la participación de MMIC ABCB5⁺ en la génesis de canales vasculogénicos y la interdependencia de la formación de canales procedentes de MMIC y el crecimiento tumoral.

El descubrimiento de la vasculogénesis impulsada por MMIC identifica la plasticidad de diferenciación selectiva como una nueva función específica de CSC a través de la cual estas subpoblaciones de cáncer tumorigénicas pueden proporcionar una ventaja de crecimiento específica para tumores en desarrollo. El hallazgo de los inventores

de una propensión de las MMIC a diferenciarse selectivamente en células capaces de cumplir una función de tejido definida necesaria para crecimiento tumoral más eficaz se asemeja a características distintivas de células madre fisiológicas, que, de manera similar, dan lugar a linajes celulares capaces de cumplir funciones específicas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis tisular mediante programas de diferenciación definidos. Cabe destacar que los inventores han descubierto que la tumorigénesis y vasculogénesis dependientes de MMIC son operativas no solo en modelos de xenotrasplantes de melanoma humano a piel murina, sino también tras el trasplante de melanoma humano a piel humana. Por lo tanto, los resultados de los inventores proporcionan pruebas iniciales de que la función de mantenimiento tumoral de las CSC humanas identificadas en ensayos de xenotrasplantes no refleja solo la capacidad limitada de las células tumorales humanas para adaptarse al crecimiento en un entorno extraño (de ratón), como se ha postulado en función de los resultados de los experimentos de trasplante de tumor murino utilizando hospedadores murinos histocompatibles¹⁷.

El concepto ahora ampliamente aceptado de angiogénesis de cáncer desarrollado por Folkman en 1971 afirma que los cánceres humanos dependen críticamente del crecimiento y desarrollo de vasos sanguíneos relacionados con el tumor¹⁸. Además de la angiogénesis clásica por la que las células cancerosas, incluyendo CSC¹⁹, inducen el crecimiento de vasos positivos para CD31, maduros, del estroma circundante²⁰, se han generado pruebas de que las células cancerosas también pueden formar directamente espacios de tipo vasos sustitutos mediante el proceso de mímica vasculogénica por el que melanomas humanos agresivos desarrollan redes modeladas compuestas por membranas basales reactivas a ácido peryódico-Schiff (PAS) y laminina y canales perfundibles asociados formados por células tumorales que expresan algunos, pero no todos, de los genes y proteínas relacionados con el endotelio⁴. El presente estudio identifica las células y los mecanismos subyacentes responsables de la mímica vasculogénica, y establece que, además de la autorrenovación, las MMIC expresan selectivamente genes vasculogénicos y forman canales compatibles con la función de promover la nutrición a tumores de crecimiento rápido. Por tanto, la angiogénesis del cáncer y la vasculogénesis impulsada por MMIC pueden representar mecanismos independientes pero potencialmente interrelacionados por los que los tumores agresivos y metabólicamente activos obtienen los nutrientes necesarios para estadios críticos de crecimiento y evolución. Esto puede ser particularmente importante durante el inicio del tumor y las fases tempranas del crecimiento tumoral cuando aún no se ha desarrollado completamente la angiogénesis impulsada por mTOR, dependiente de hipoxia del estroma circundante²¹.

Recientemente, se ha establecido una prueba de principio para la posible utilidad terapéutica del concepto de CSC^{3,22}. Por lo tanto, La identificación de un mecanismo vasculogénico mediante el que las MMIC pueden contribuir al crecimiento tumoral tiene implicaciones terapéuticas potencialmente importantes. Estudios previos revelaron que las células de melanoma humano normalmente resistentes se vuelven sensibles *in vitro* a los efectos de los agentes quimioterapéuticos por el bloqueo mediado por mAb o ARNip de ABCB5^{5,6} y que la unión de mAb con ABCB5 es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria eficaz contra el melanoma a través de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) *in vivo*³. Ahora, el reconocimiento del papel de MMIC en la vasculogénesis tumoral también permitirá el desarrollo de estrategias centradas en la inhibición de las rutas moleculares relevantes integrales para la plasticidad de CSC dirigida al endotelio. Por otra parte, la localización espacial del componente de MMIC en los canales que se comunican con la circulación sistémica puede hacer que este determinante importante de la virulencia del cáncer sea particularmente vulnerable a la dirección terapéutica.

Ejemplo 5: Rutas vasculogénicas/angiogénicas en melanoma humano.

Los inventores investigaron las relaciones génicas basadas en el análisis de la ruta Ingenuity. Los inventores prepararon una representación gráfica de la activación de la ruta a través de MMIC ABCB5⁺. Los genes que se sobreexpresaron en células de melanoma humano ABCB5⁺ en relación con ABCB5⁻ estaban representados por nodos rojos (círculos) y los expresados en niveles menores estaban representados por nodos negros. Se dibujaron líneas negras entre los genes para mostrar interacciones conocidas. Se observaron las funciones génicas conocidas en la vasculogénesis y la angiogénesis y genes conocidos como dianas farmacológicas relevantes (líneas rojas) (figura 1a). Los inventores examinaron la expresión de miembros de la ruta vasculogénica/angiogénica mediante RT-PCR en MMIC ABCB5⁺. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 1b. Se usó citometría de flujo de color doble usando clasificación celular específica de fenotipo de ABCB5 para determinar la expresión de la proteína FLT1 (VEGFR-1) de MMIC ABCB5⁺ (figura 1c, arriba) y células de melanoma ABCB5 (figura 1c, abajo). Se examinó la expresión de CD144 en subpoblaciones de células de melanoma MMIC ABCB5⁺ o ABCB5⁻ mediante tinción de inmunofluorescencia antes de (t = 0 h) y tras 48h de cultivo (t = 48 h) en presencia de VEGF 100 ng/ml¹¹. Se muestra en la figura 1d tinción de inmunofluorescencia representativa para la expresión de CD144 (Texas red), con núcleos contrateñidos en azul (DAPI). Los porcentajes medios (media ± e.t.m., n = 3 experimentos repetidos) de células con tinción positiva para CD144 en cada muestra se muestran a la derecha. Se examinó la expresión de CD144 en células de melanoma en presencia de VEGF 100 ng/ml como se ha indicado anteriormente, pero en presencia o ausencia de mAb de bloqueo anti-FLT1 (VEGFR-1) o mAb de control de isotipo. Se muestra en la figura 1e tinción de inmunofluorescencia representativa para la expresión de CD144 (Texas red) por células de melanoma cultivadas durante 48 h (t = 48 h), con núcleos contrateñidos en azul (DAPI). Los porcentajes medios (media ± e.t.m., n = 3 experimentos repetidos) de células con tinción positiva para CD144 en cada muestra se muestran en el panel del extremo derecho. Se examinó la formación de tubos mediante microscopía óptica de contraste de fase de células de melanoma cultivadas durante 24 h (t = 24 h) en presencia de VEGF 100 ng/ml y la presencia o ausencia de mAb de bloqueo anti-FLT1 (VEGFR-1) o mAb de control de isotipo (figura 1f). El número de tubos/campo de microscopía

(media \pm e.t.m., $n = 3$ experimentos repetidos) y la longitud del tubo (μm) (media \pm e.t.m., $n = 3$ experimentos repetidos) se ilustran para las diferentes condiciones experimentales en los paneles del extremo derecho, respectivamente. Se examinó el potencial de diferenciación de células de melanoma humano ABCB5⁺ y ABCB5⁻ a lo largo de una ruta adipogénica (figura 1 h, tinción con Oil Red O, los núcleos se contratiñen con hematoxilina) y ruta osteogénica (figura 1i, tinción con rojo de alizarina). También se examinó el potencial de diferenciación miogénica de células de melanoma humano ABCB5⁺ y ABCB5⁻ (figura 1j). Se detectó ausencia de tinción de miogenina (FITC, verde) en células de melanoma humano ABCB5⁺ o ABCB5⁻ (los núcleos se contratiñen con DAPI).

Ejemplo 6: Vasculogénesis *in vivo* impulsada por MMIC.

Se investigó la vasculogénesis impulsada por MMIC *in vivo*. Las secciones de melanoma humano que crecían en el sitio de inyección de células de melanoma dentro de la dermis humana de xenoinjerto de piel a ratón NOD/SCID se tiñeron convencionalmente con hematoxilina y eosina (figura 2a). También se examinó mediante inmunohistoquímica la expresión de CD31 humano que indicaba una respuesta angiogénica en el perímetro del melanoma dentro del xenoinjerto humano. (figura 2b, la línea discontinua representa la interfaz del nódulo tumoral con tejido conectivo dérmico). Se usó tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) (con diastasa), una tinción inmunoquímica de regiones interiores negativas para CD31 de xenoinjertos de melanoma, para revelar numerosos canales de anastomosis (figura 2c, el recuadro es inmunohistoquímica de laminina que indica un patrón idéntico). Se realizaron microfotografías electrónicas de transmisión de regiones interiores de xenoinjertos de melanoma (figura 2d) y se descubrió que los espacios luminales que contenían productos sanguíneos (eritrocitos) están revestidos por células de melanoma y una matriz extracelular de tipo membrana basal asociada. Se examinó la zona interior del xenoinjerto de melanoma procedente de células que expresan el transgén de GFP y teñidas inmunohistoquímicamente para el marcador endotelial CD144 (cromógeno rojo); los resultados se muestran en la (figura 2e). Los inventores descubrieron que la expresión de CD144 se limita a células que forman espacios de tipo luz revestidos por células que coexpresan GFP y CD144 (indicados como amarillo-naranja). También se realizó inmunohistoquímica, con aumento bajo (figura 2f) y alto (figura 2 g), para la proteína ABCB5; los resultados de los inventores muestran que la reactividad está restringida a canales de anastomosis idénticos a los observados en la figura 2c. El recuadro en la figura 2f representa una formación similar de canales reactivos a ABCB5 en una biopsia de melanoma procedente del paciente. Se realizó hibridación *in situ* para ARNm de ABCB5 (figura 2h). Los resultados de los inventores revelan un patrón de canal correspondiente al de la expresión de la proteína ABCB5 (compárese con la figura 2f; el recuadro es control con sentido). Se examinó la expresión de ABCB5 en xenoinjertos de melanoma después de la administración intravenosa *in vivo* (figura 2h). Se realizó detección de mAb anti-ABCB5 usando inmunohistoquímica anti-Ig de ratón; obsérvese la localización en canales (el recuadro representa la tinción de anti-Ig de ratón después de la administración intravenosa de mAb de control de isotipo coincidente irrelevante). Se realizó microscopía de inmunofluorescencia de marcaje doble para ABCB5 (verde), CD144 (rojo), y ABCB5 y CD144 (mezcla) (figura 2j) y ABCB5 (verde), TIE-1 (rojo), y ABCB5 y TIE-1 (mezcla) (figura 2j).

Ejemplo 7: Interdependencia de la vasculogénesis y la tumorigénesis impulsadas por MMIC.

Se examinó la expresión de ABCB5 mediante citometría de flujo; se representó la tinción de ABCB5 o control (FITC, F11) se frente a la dispersión directa (FSC) para inóculos de células de melanoma humano A375, MUM-2B y MUM-2C. Se muestran datos representativos en la figura 3a. Se examinaron secciones histológicas de melanomas que se desarrollaron a partir de tres líneas celulares de melanoma no segregadas y empobrecidas en ABCB5 inyectadas por vía intradérmica en xenoinjertos de piel humana. Se muestran secciones representativas en la figura 3b. Se usó histología para determinar la tasa de formación de tumor (%) 3 semanas después del trasplante intradérmico de células de melanoma A375, MUM-2B o MUM-2C humanas no segregadas frente a empobrecidas en ABCB5⁺ (2×10^6 /inóculo) en piel humana/ratones quiméricos Rag2^{-/-} ($n = 5$, respectivamente). (Figura 3c). Se determinaron los volúmenes tumorales histológicos (media \pm e.t.m.) 3 semanas después del trasplante intradérmico de células de melanoma A375, MUM-2B o MUM-2C humanas no segregadas frente a empobrecidas en ABCB5⁺ (2×10^6 /inóculo) en piel humana/ratones quiméricos Rag2^{-/-}. (Figura 3d). Se realizó inmunohistoquímica para laminina. Los resultados de los inventores mostraron el grado de formación de canales en melanomas que se desarrollaron a partir de inóculos de células de melanoma no segregadas o empobrecidas en ABCB5⁺ procedentes de las líneas A375, MUM-2B o MUM-2C inyectadas por vía intradérmica en xenoinjertos de piel humana (flechas = necrosis). (Figura 3e). Se realizó un análisis de imágenes de la inmunorreactividad de laminina para melanomas procedentes de inóculos de células no segregadas y empobrecidas en ABCB5⁺. Los datos se muestran en la figura 3f; el eje y es el porcentaje del área pixelada con reactividad (media \pm e.t.m.); la barra rellena representa tumores procedentes de células de melanoma no segregadas, las barras vacías representan tumores procedentes de células empobrecidas en ABCB5⁺ (A375, $P < 0,0032$; MUM-2B, $P < 0,0005$; MUM-2C, $P < 0,0059$).

Ejemplo 8: Correlación de la expresión de la proteína ABCB5 y ARNm a través de líneas celulares de melanoma humano.

Se examinó la expresión de ABCB5 y tubulina en un panel de líneas celulares de melanoma humano mediante análisis de transferencia de Western (figura 4a). Se examinó la expresión relativa de ARNm de ABCB5 (\log_2) en un panel de líneas celulares de melanoma humano representadas frente a la expresión de la proteína ABCB5 según lo determinado por las relaciones de intensidad de banda de transferencia de Western de 89 kD de ABCB5 e

intensidad de banda de transferencia de Western de tubulina para cada línea celular de melanoma humano. (Figura 4b). Los puntos de datos son los siguientes: 1, SK-MEL-2; 2, SK-MEL-5; 3, SK-MEL-28; 4, MDA-MB-435; 5, UACC-62; 6, UACC-257; 7, M14; 8, MALME-3M. r de correlación de rangos de Spearman (corregido con respecto a empates).

5

Ejemplo 9: Genes asociados a CSC identificados al nivel de proteínas

10

Usando inmunotinción de superficie celular y citometría de flujo, se identificaron genes adicionales que se regulan de manera diferencial al nivel de proteínas en CSC ABCB5⁺ frente a poblaciones generales de cáncer ABCB5⁻. Estas son todas moléculas inmunomoduladoras y las reguladas positivamente en células ABCB5⁺ pueden ser relevantes para el escape de la inmunovigilancia y ser responsables de la resistencia a la inmunoterapia en el melanoma maligno, es decir, cuando las dianas son los genes sobreexpresados en células ABCB5⁺, se predice que el melanoma se sensibiliza al ataque y a la terapia inmunitarios.

Tabla 8: Reguladas positivamente en CSC ABCB5 ⁺ en comparación con poblaciones de cáncer generales ABCB5 ⁻ :
MHC de clase II
CD28
CD86
PD-1
CD40-L
4-1BB-L
B7-H4
GITR

15

Tabla 7: Reguladas negativamente en CSC ABCB5 ⁺ en comparación con poblaciones generales de cáncer ABCB5 ⁻
MHC de clase I
CD80
PD-L1
ICOS-L

Referencias para descripción detallada y ejemplos

20

1 M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 100 (7), 3983 (2003); D. Bonnet y J. E. Dick, Nat Med 3 (7), 730 (1997); C. A. O'Brien, A. Pollett, S. Gallinger *et al.*, Nature 445 (7123), 106 (2007); L. Ricci-Vitiani, D. G. Lombardi, E. Pilozzi *et al.*, Nature 445 (7123), 111 (2007); S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke *et al.*, Nature 432 (7015), 396 (2004).

25

2 T. Schatton y M. H. Frank, Pigment cell & melanoma research 21 (1), 39 (2008).
 3 T. Schatton, G. F. Murphy, N. Y. Frank *et al.*, Nature 451 (7176), 345 (2008).
 4 A. J. Maniotis, R. Folberg, A. Hess *et al.*, Am J Pathol 155 (3), 739 (1999).
 5 N. Y. Frank, A. Margaryan, Y. Huang *et al.*, Cancer Res 65 (10), 4320 (2005).
 6 Y. Huang, P. Anderle, K. J. Bussey *et al.*, Cancer Res 64 (12), 4294 (2004).
 7 L. Chin, L. A. Garraway y D. E. Fisher, Genes Dev 20 (16), 2149 (2006).
 8 G. I. Keshet, I. Goldstein, O. Itzhaki *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 368 (4), 930 (2008).

30

9 J. F. Sousa y E. M. Espreafico, BMC cancer 8, 19 (2008).
 10 N. Y. Frank, A. T. Kho, T. Schatton *et al.*, J Cell Biol 175 (1), 99 (2006).
 11 K. Nishiyama, K. Takaji, Y. Uchijima *et al.*, J Biol Chem 282 (23), 17200 (2007).
 12 D. Fang, T. K. Nguyen, K. Leishear *et al.*, Cancer Res 65 (20), 9328 (2005).
 13 I. Juhasz, S. M. Albelda, D. E. Elder *et al.*, Am J Pathol 143 (2), 528 (1993).
 14 E. Monzani, F. Facchetti, E. Galmozzi *et al.*, Eur J Cancer 43 (5), 935 (2007).
 15 W. M. Klein, B. P. Wu, S. Zhao *et al.*, Mod Pathol 20 (1), 102 (2007).
 16 E. A. Seftor, P. S. Meltzer, D. A. Kirschmann *et al.*, Clin Exp Metastasis 19 (3), 233 (2002).
 17 P. N. Kelly, A. Dakic, J. M. Adams *et al.*, Science 317 (5836), 337 (2007).
 18 J. Folkman, N Engl J Med 285 (21), 1182 (1971).

40

19 S. Bao, Q. Wu, S. Sathornsumetee *et al.*, Cancer Res 66 (16), 7843 (2006); R. J. Gilbertson y J. N. Rich, Nat Rev Cancer 7 (10), 733 (2007).

- 20 B. N. Perry y J. L. Arbiser, *J Invest Dermatol* 126 (10), 2160 (2006).
21 M. Guba, P. von Breitenbuch, M. Steinbauer *et al.*, *Nat Med* 8 (2), 128 (2002).
22 Z. F. Yang, D. W. Ho, M. N. Ng *et al.*, *Cancer Cell* 13 (2), 153 (2008); S. Bao, Q. Wu, Z. Li *et al.*, *Cancer Res* 68 (15), 6043 (2008).
5 23 N. Y. Frank, S. S. Pendse, P. H. Lapchak *et al.*, *J Biol Chem* 278 (47), 47156 (2003).
24 D. Donovan, N. J. Brown, E. T. Bishop *et al.*, *Angiogenesis* 4 (2), 113 (2001).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el cáncer es melanoma, comprendiendo la composición: una molécula aislada que se une selectivamente a un polipéptido codificado por un gen asociado a CSC en un célula madre ABCB5⁺ del individuo, en donde el gen asociado a CSC es PD-1, en donde la molécula aislada se conjuga con un agente terapéutico y en donde la molécula aislada es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, en donde el agente terapéutico es un mAb que se une a ABCB5.
- 10 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un un anticuerpo de cadena sencilla, F(ab')₂, Fab, Fd, Fv o fragmento Fv de cadena sencilla.

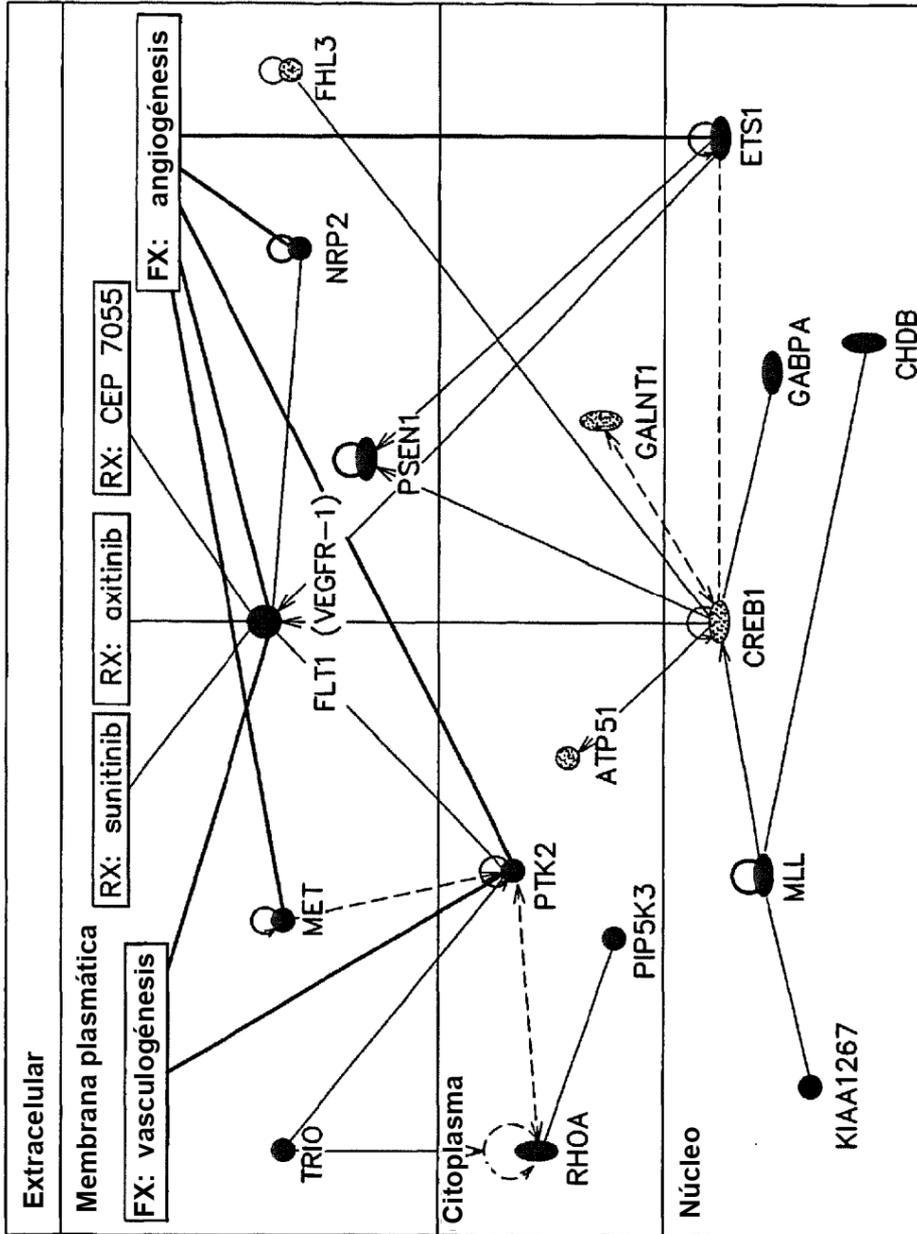


FIG. 1A

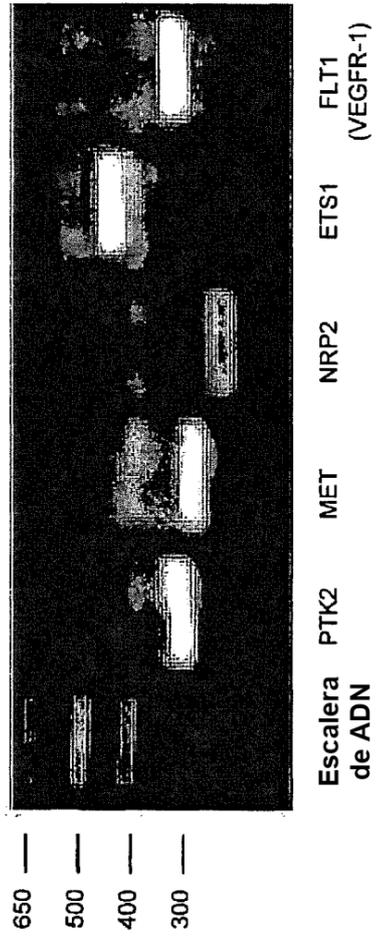


FIG. 1B

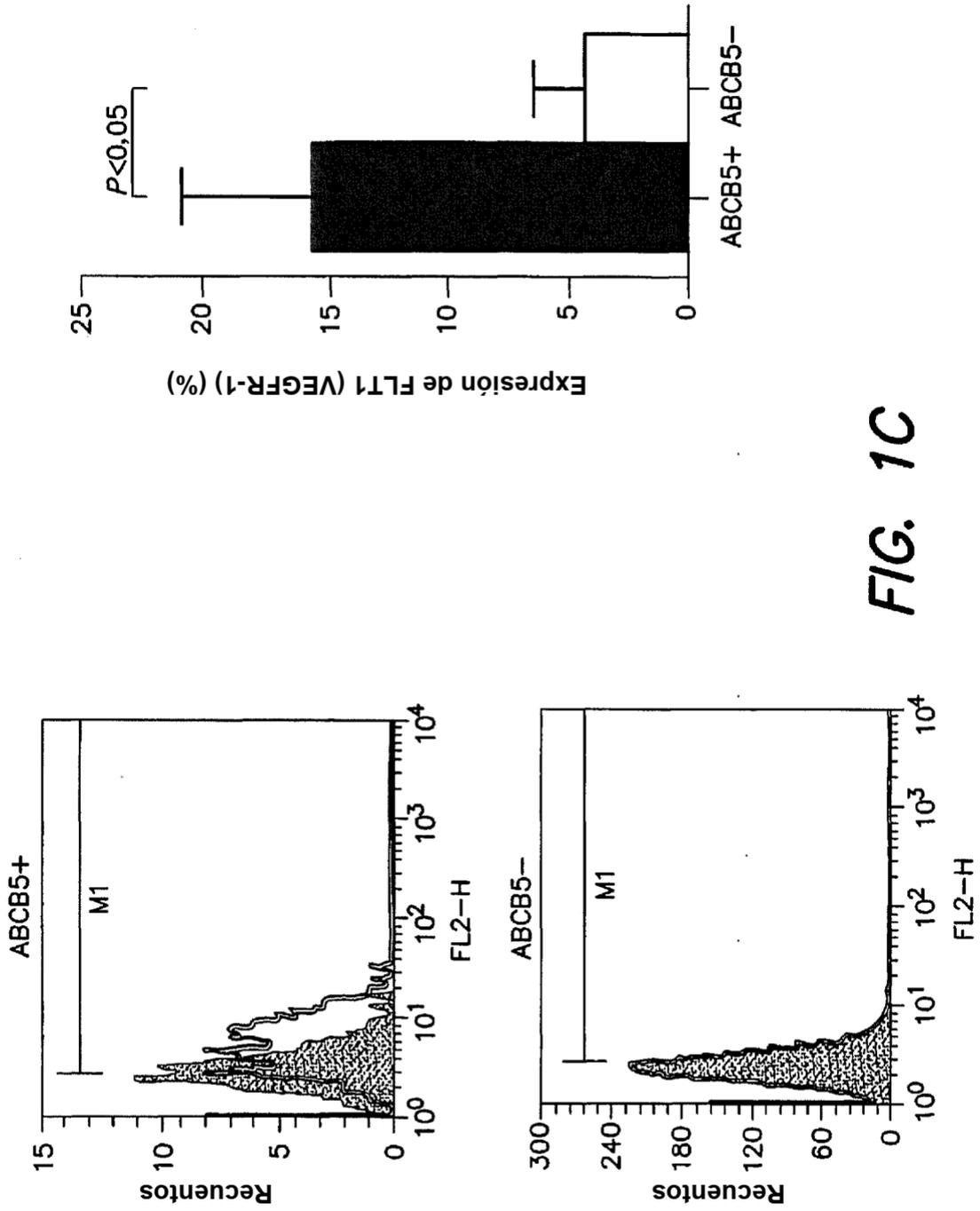


FIG. 1C

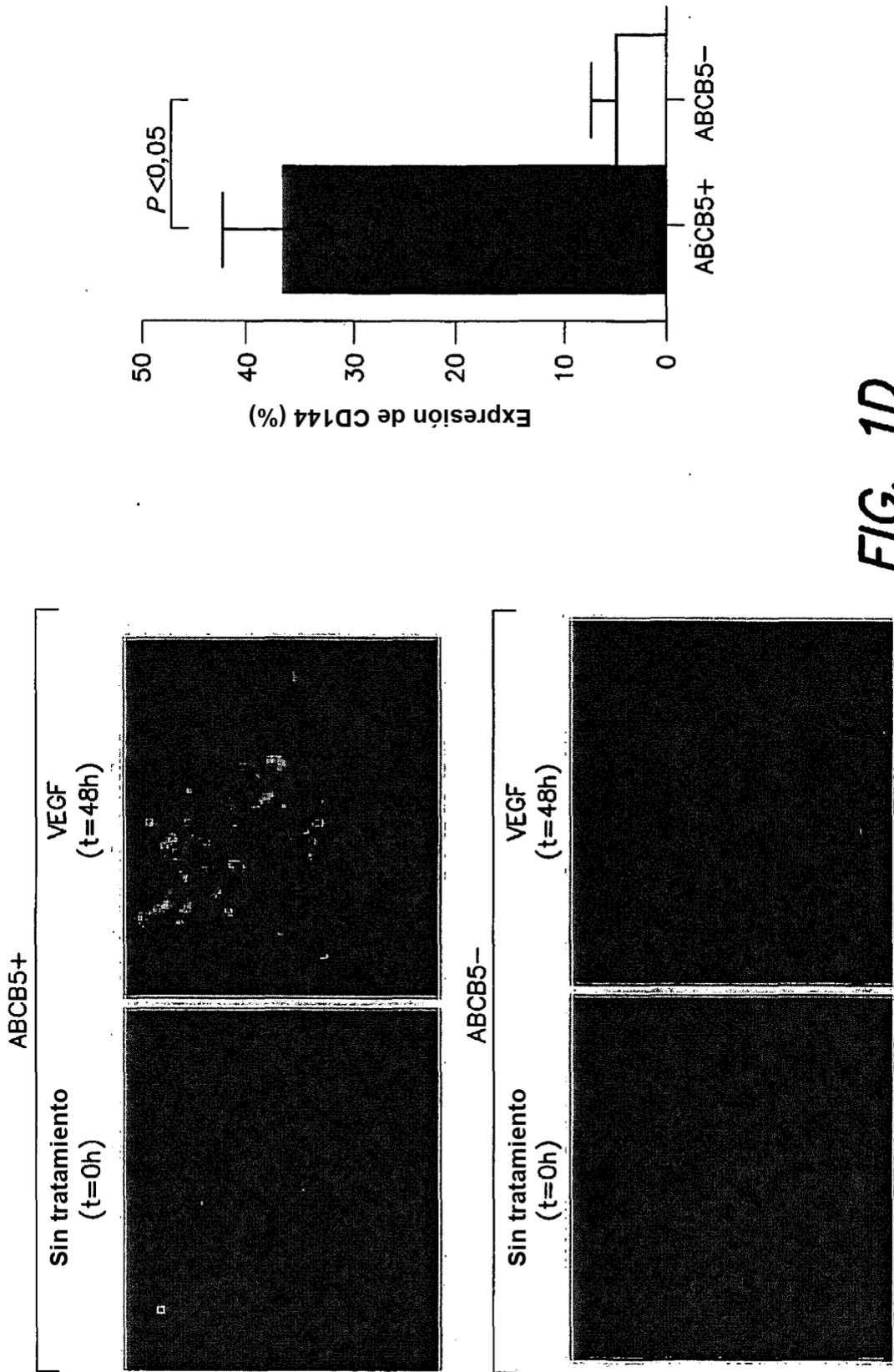


FIG. 1D

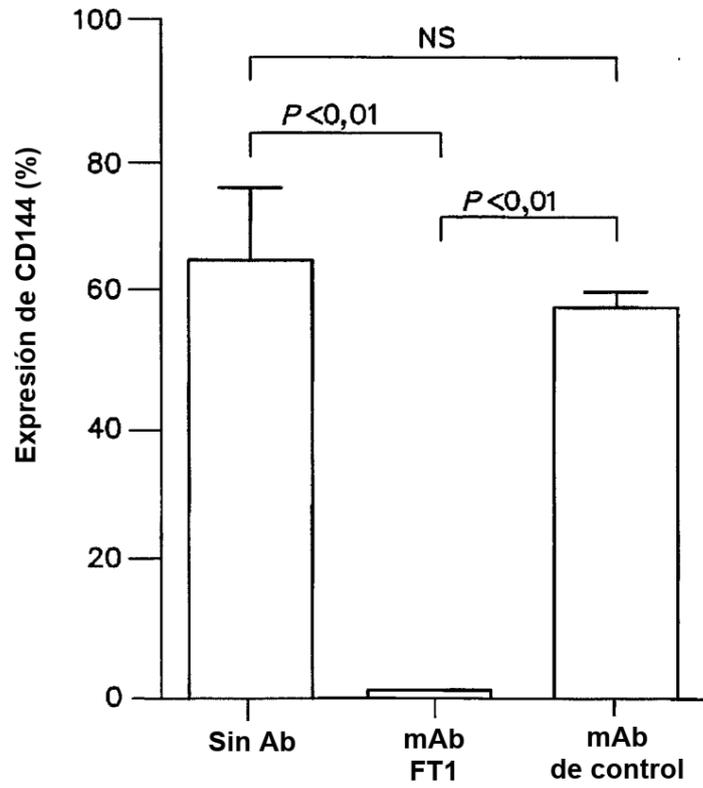
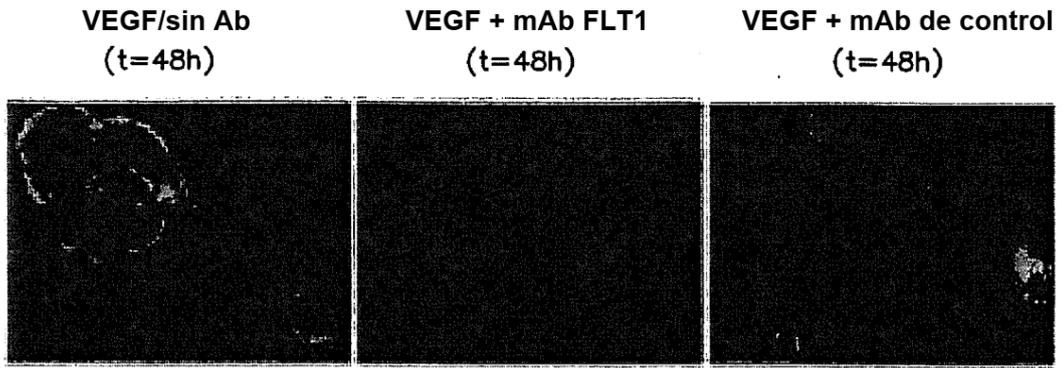


FIG. 1E

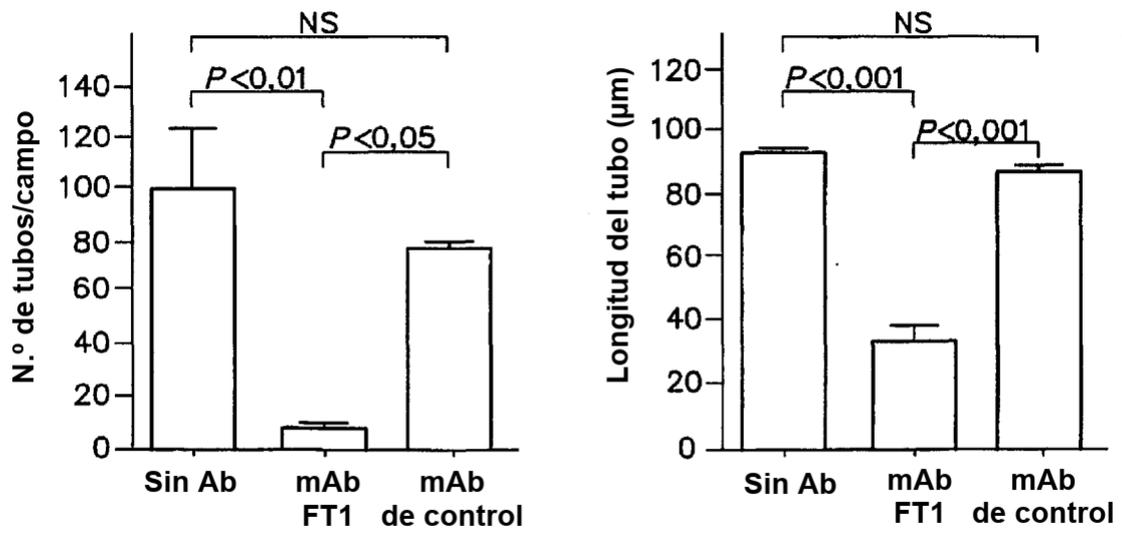
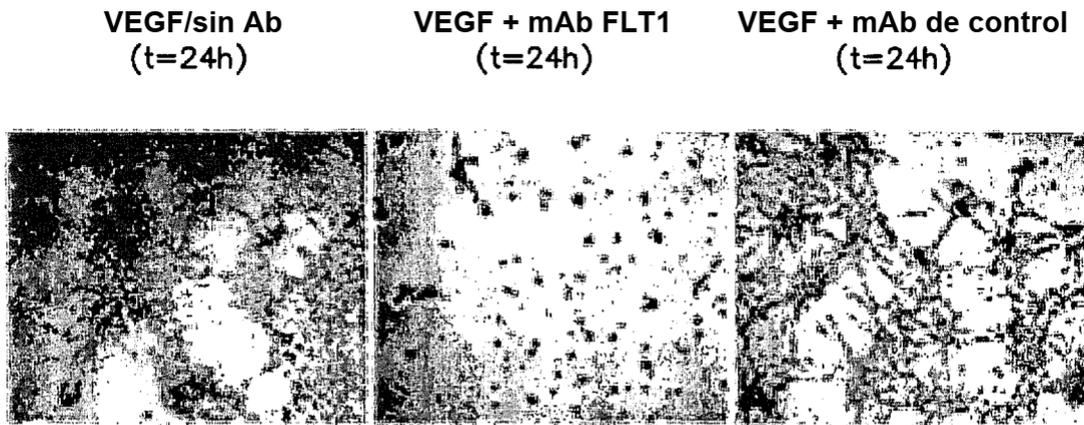


FIG. 1F

Diferenciación adipogénica

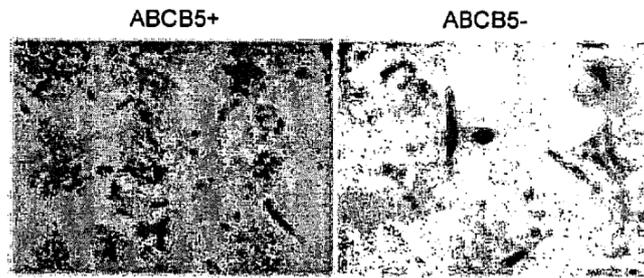


FIG. 1G

Diferenciación osteogénica

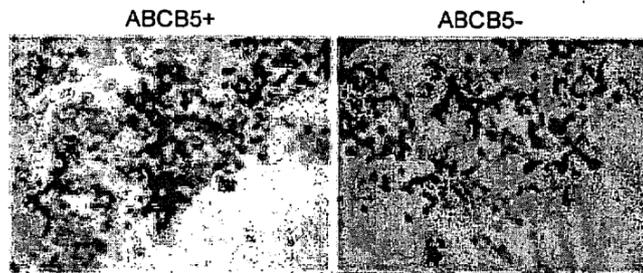


FIG. 1H

Diferenciación miogénica

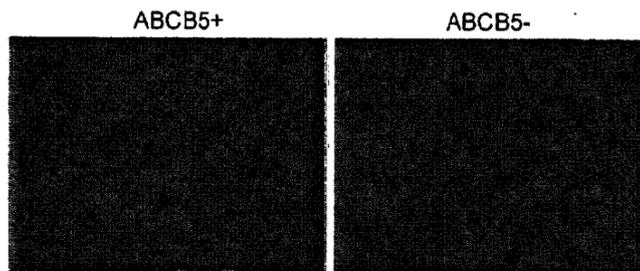


FIG. 1I

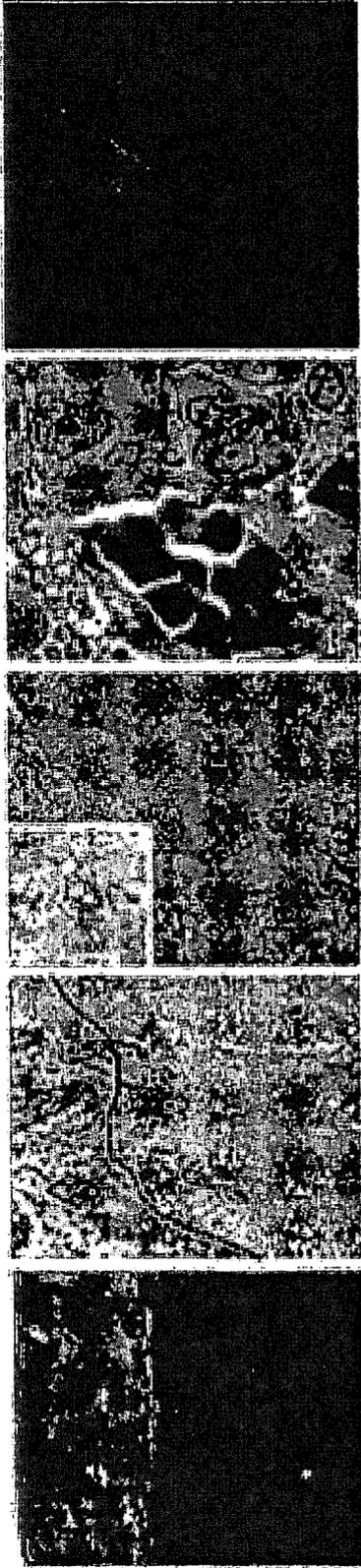


FIG. 2A **FIG. 2B** **FIG. 2C** **FIG. 2D** **FIG. 2E**



FIG. 2F **FIG. 2G** **FIG. 2H** **FIG. 2I**

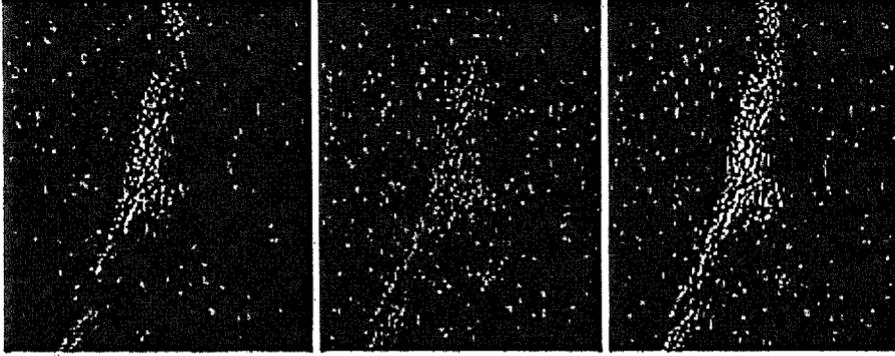


FIG. 2J

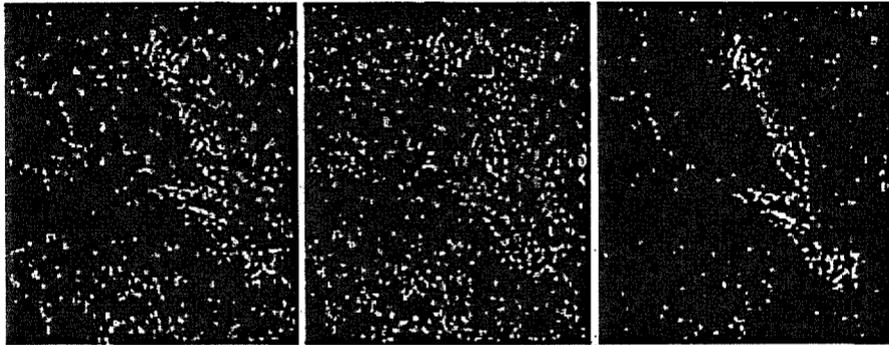


FIG. 2K

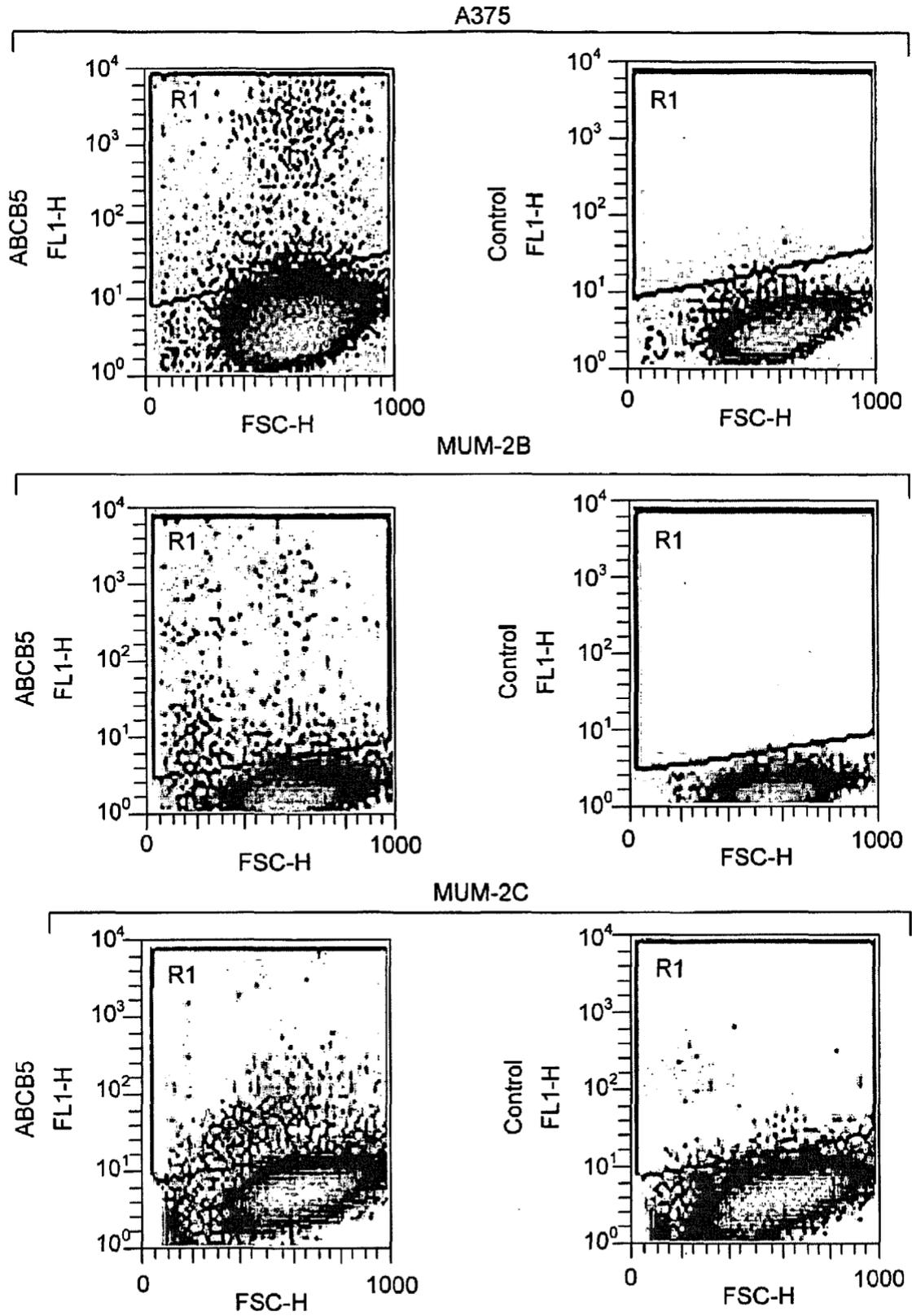
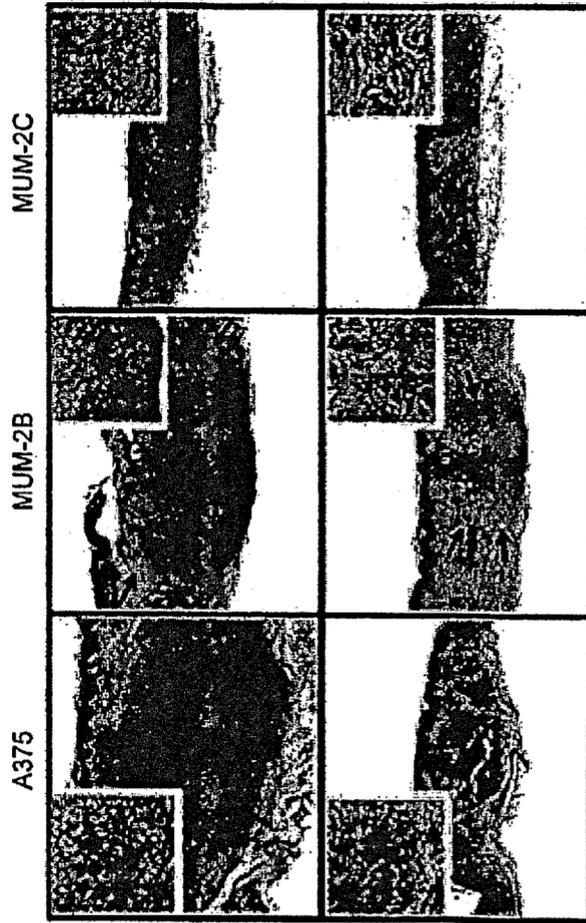


FIG. 3A



Sin segregar

Empobrecidas en ABCB5+

FIG. 3B

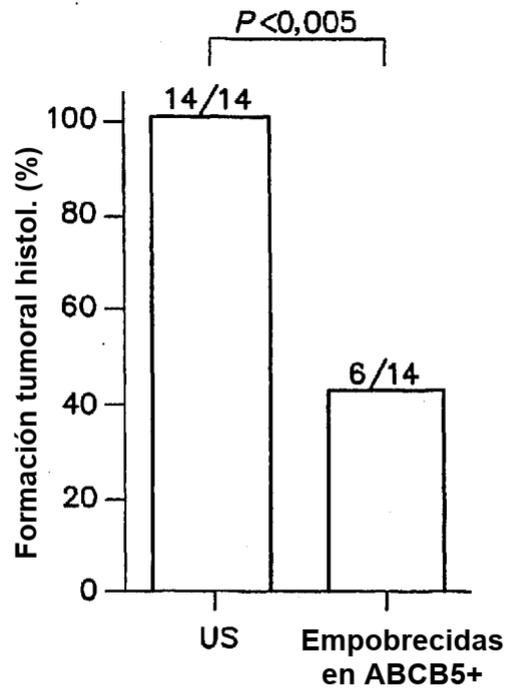


FIG. 3C

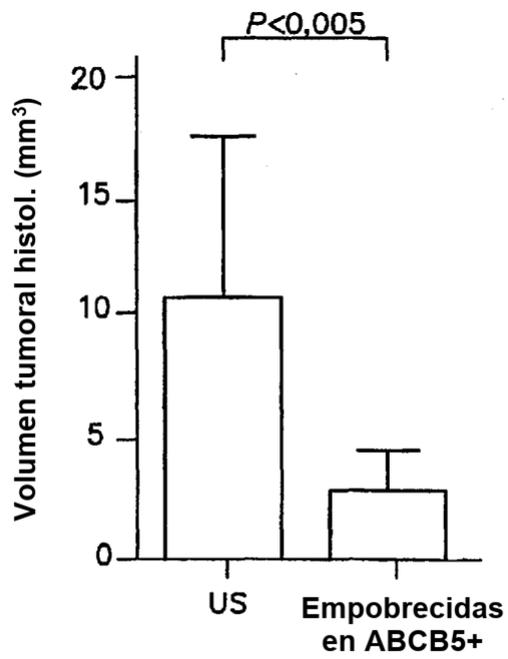


FIG. 3D

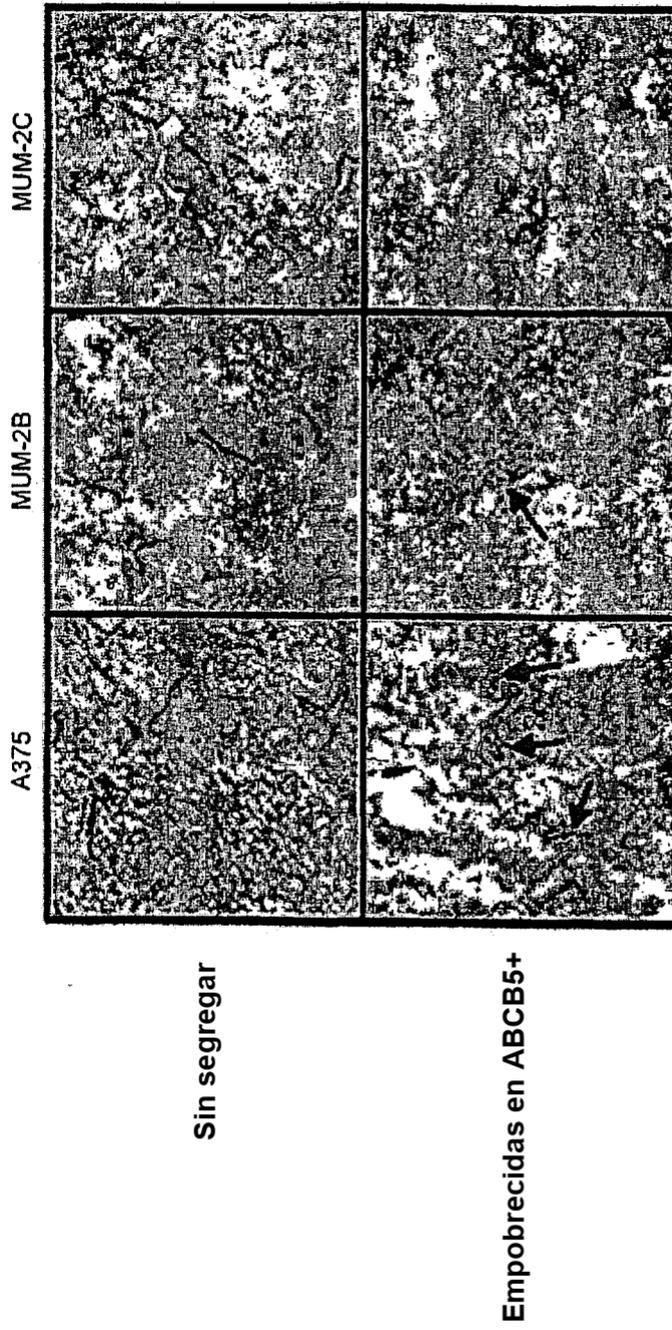


FIG. 3E

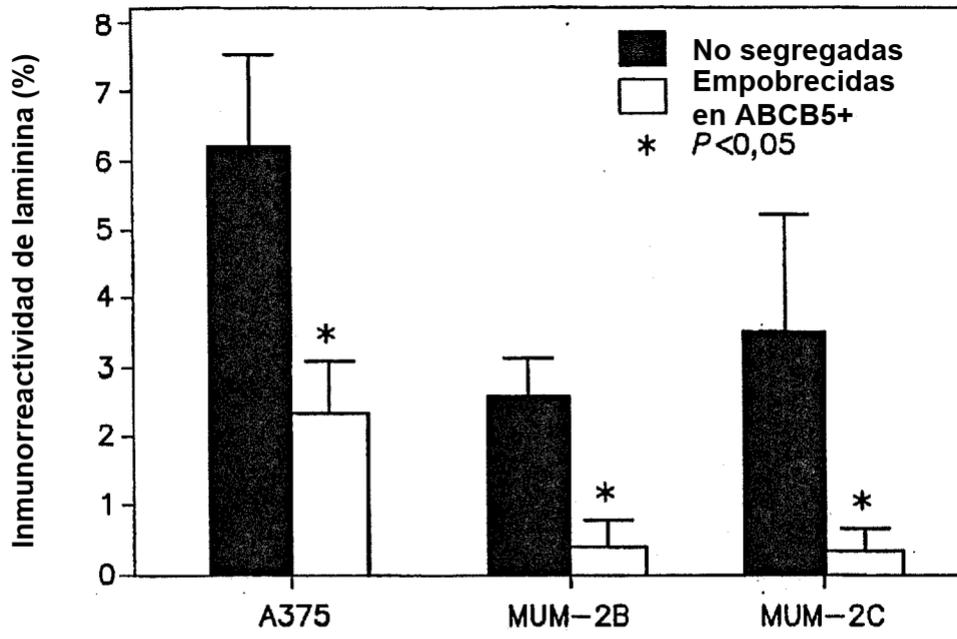


FIG. 3F

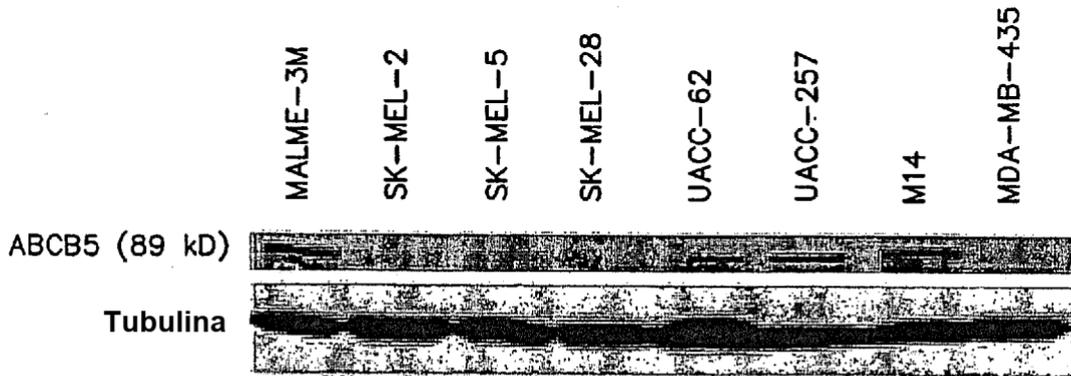


FIG. 4A

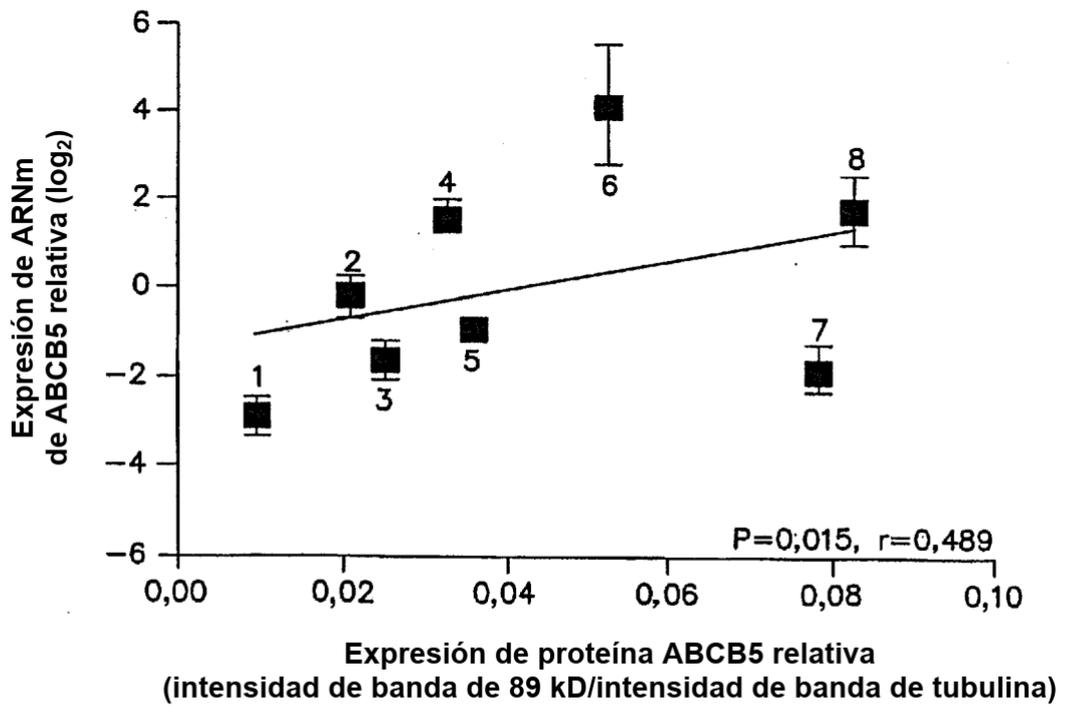


FIG. 4B