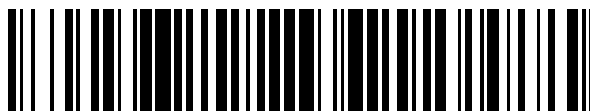


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 986**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2010 PCT/IL2010/000581**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11010309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2010 E 10747679 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2457089**

54 Título: **Un método de diagnóstico de cáncer**

30 Prioridad:

21.07.2009 US 227130 P

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

15.04.2020

73 Titular/es:

**TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH
INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.
(100.0%)**

**The Chaim Sheba Medical Center Tel HaShomer
52 621 Ramat Gan, IL**

72 Inventor/es:

MARKEL, GAL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 753 986 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

Un método de diagnóstico de cáncer

APLICACIÓN(ES) RELACIONADA(S)

5 **[0001]** Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo 35 USC 119(e) de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Núm. 61/227,130 presentada el 21 de julio de 2009, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

10 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos para el diagnóstico de cáncer, específicamente el melanoma.

15 **[0003]** El cáncer es una clase de enfermedades en las que un grupo de células muestra *un crecimiento incontrolado* (división más allá de los límites normales), *invasión* (intrusión y destrucción de tejidos adyacentes) y, a veces, *metástasis*. El cáncer afecta a personas de todas las edades con el riesgo de que la mayoría de los tipos aumente con la edad. El cáncer causó aproximadamente el 13% de todas las muertes humanas en 2007 (7,6 millones).

20 **[0004]** Existe la necesidad de una prueba de diagnóstico rápida, económica y precisa para el cáncer.

[0005] La familia de proteína humana carcinoembrionaria Ag (CEA) abarca varias formas de proteínas con diferentes características bioquímicas. Todos los genes de la familia CEA se han clasificado en dos subfamilias principales, la molécula de adhesión celular CEA (CEACAM) y los subgrupos de glucoproteínas específicas del embarazo. Las proteínas CEACAM, que forman parte de la superfamilia de Ig más grande, incluyen CEACAM1, -3, -4, -5, -6, -7 y -8. Comparten una estructura básica común de forma secuencial ordenó diferentes dominios similares a Ig con un considerable grado de homología. CEACAM5 está vinculado a GPI con la superficie celular, pero también aparece en forma soluble en la sangre periférica, donde es más reconocido como el marcador tumoral CEA utilizado para controlar a los pacientes con cáncer colorrectal. CEACAM 1 es una proteína transmembrana que se puede detectar en algunas células inmunes, así como en células epiteliales [Hammarström S (1999). *Semin Cancer Biol* 9: 67-81]. Se observó una asociación sorprendente entre la presencia de CEACAM1 unida a células en las lesiones de melanoma cutáneo primario y el desarrollo de enfermedad metastásica con mal pronóstico [Thies A et al. (2002) *J Clin Oncol* 20: 2530-2536]. La fuerza pronóstica del CEACAM 1 asociado al melanoma fue similar o incluso superior al puntaje de Breslow ampliamente aceptado [Thies et al. *Supra*]. Sorprendentemente, se observó una asociación similar en el adenocarcinoma de pulmón específicamente [Laack et al (2002) *J Clin Oncol* 20: 4279-4284] pero también en general en los cánceres de pulmón de células no pequeñas [Sienel et al (2003) *Clin Cancer Res* 9: 2260-2266].

[0006] Curiosamente, se ha observado la presencia de proteína CEACAM1 soluble humana en el suero de donantes sanos [Dráberová et al (2000) *Immunology* 101: 279-287; Kondo y cols. (2001). *J Gastroenterol* 36: 470-475; Svenberg y col. (1979) *Clin Exp Immunol* 36: 317-325] y se encontró elevado en el suero de pacientes con enfermedades biliares que incluyen ictericia obstructiva, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune y colangiocarcinoma. Además, se ha demostrado recientemente que el nivel sérico de CEACAM1 aumenta en algunos pacientes con adenocarcinoma pancreático [Simeone et al (2007) *Pancreas* 34: 436-443], presentando evidencia del papel potencial de CEACAM1 soluble como marcador tumoral. Normalmente, los linfocitos circulantes no expresan CEACAM1 [Moller et al (1996) *Int J Cancer* 65: 740-745; Kammerer et al (1998) *Eur J Immunol* 28: 3664-3674], ya que se regula por aumento en los linfocitos principalmente después de la activación.

[0007] La solicitud de EE.UU. 20070071758 se refiere a métodos para diagnosticar cáncer in vitro e in vivo usando un agente de unión a CEACAM1 conjugado con un resto detectable.

[0008] La Solicitud de Estados Unidos 20080108140 respecto CEACAM1 como un biomarcador para la infección por CMV congénita.

[0009] La Solicitud de Estados Unidos 20090181403 refiere a la utilización de CEACAM1 como un biomarcador para el cáncer. En particular, esta aplicación se refiere a la detección y medición de niveles solubles de CEACAM1 para la detección y diagnóstico de melanoma.

[0010] US 2007/110668 describe la identificación de un mecanismo inhibidor de clase I MHC-Independiente de citotoxicidad NK humana en una familia de pacientes TAP2 deficientes. Se descubrió que aunque la deficiencia de TAP2 conduce a una reducción en la expresión de MHC de Clase I, la citotoxicidad mediada por NK todavía está inhibida por las interacciones homofílicas de CEACAM1.

[0011] Gray-Owen et al. resume en *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, nr. 6, p. 433-446, un artículo de revisión, el papel de las proteínas CEACAM en la infección, inflamación y cáncer. Se informa que CEACAM 1 está involucrado en la inmunidad, que actúa como un correceptor regulador para los tipos de células linfoides y mieloides.

[0012] Kammerer et al. describe en Journal of Pathology 200411, vol. 204, no. 3, p. 258-267, una investigación de la expresión de CEACAM1 en carcinomas de células renales y renales normales (RCC), y descubrió que la expresión de CEACAM1 estaba completamente regulada a la baja en todas las muestras de RCC, pero podría ser reinducida por estimulación con interferón- γ (IFN γ). Los autores también caracterizaron TIL de cinco RCC y descubrieron que la expresión de CEACAM1 en células NK y T recién aisladas del tejido tumoral era indetectable (células NK) o baja (células T), lo que se considera característico de las células no estimuladas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de diagnóstico de melanoma, comprendiendo el método determinar un nivel de CEACAM1 en linfocitos de sangre periférica aislados (PBL) de un sujeto que lo necesita, en el que una regulación al alza del nivel de CEACAM1 por encima de un umbral predeterminado es indicativo de melanoma en el sujeto.

[0014] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los PBLs comprenden células T.

[0015] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los PBLs comprenden células NK.

[0016] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la determinación de un nivel de CEACAM1 en linfocitos de sangre periférica aislados (PBL) se realiza por FACS. El método puede comprender además informar al sujeto sobre la presencia o ausencia del melanoma o la etapa del mismo.

[0017] De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende, además, validar el diagnóstico o pronóstico usando un método seleccionado del grupo que consiste de biopsia quirúrgica, tratamiento de imágenes, la patología y el ensayo molecular.

[0018] La determinación se efectúa ex vivo.

[0019] A menos que se defina otra cosa, todos los técnicos y/o científicos términos utilizados aquí tienen el mismo significado que comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, prevalecerá la especificación de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0020] Algunas realizaciones de la invención se describen aquí, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la materia cómo se pueden practicar las realizaciones de la invención.

[0021] En los dibujos:

FIGS. 1A-D son gráficos que ilustran la alta expresión de CEACAM1 en linfocitos circulantes entre pacientes con melanoma. Una distribución de dispersión del perfil de expresión de CEACAM1 en las células NK circulantes se muestra en la Figura 1a o las células T en la Figura 1b. Hay tres grupos principales de muestras, donantes sanos (cuadrados negros), pacientes sin evidencia de enfermedad (NED, triángulos verticales negros) y pacientes con evidencia de enfermedad (WED, triángulos inversos negros). Cada forma individual representa una muestra única del mismo grupo. El eje Y indica el porcentaje de linfocitos circulantes positivos para CEACAM1. (Figuras 1c-d) Los pacientes con WED se clasificaron en pacientes que murieron de enfermedad (DOD) durante el seguimiento y pacientes que permanecieron vivos con enfermedad (AWD). La Figura muestra la distribución de dispersión CEACAM1 en células NK circulantes (Figura 1c) o células T (Figura 1d) en estos subgrupos. Las líneas horizontales indican el valor medio del grupo. La prueba t paramétrica no paramétrica se usó para comparar entre diferentes grupos, como se indica en cada gráfico. * denota valor $P < 0,05$, ** denota valor $P < 0,01$ y *** denota valor $P < 0,001$.

FIGS. 2A-C son gráficos que muestran una expresión funcional CEACAM1 mejorada que inhibe la actividad de destrucción de NK. Figura 2a: los gráficos muestran el perfil de expresión de CEACAM1 en células NK de sangre periférica activadas. Las muestras se derivaron de donantes sanos o de pacientes con melanoma, como se indica en la figura. Figura 2b: se analizaron los linfocitos de sangre periférica para determinar la actividad natural de destrucción contra las células 221 sensibles a NK. Las células diana se transfectaron de forma simulada (221/Simulación - barras negras) o se transfectaron de forma estable con ADNc de CEACAM1 (221/CEACAM1 - barras grises). La relación efecto-objetivo fue de 50 a 1. El eje Y denota el porcentaje de lisis específica de las células diana. La figura muestra un experimento representativo de los 3 realizados. * indica valor de $P < 0,05$ Figura 2c Los linfocitos de sangre periférica derivados de un donante sano se

cultivaron en medio de cultivo o en suero. El suero se obtuvo de un donante sano alogénico o de pacientes con melanoma con un porcentaje bajo o alto de linfocitos positivos para CEACAM1, como se indica en la figura. Se analizaron los linfocitos de sangre periférica de cuatro donantes diferentes, cada uno en tres muestras de suero diferentes de cada categoría. Las figuras muestran los resultados de la tinción de linfocitos cerrados de un experimento representativo.

FIG. 3 ilustra la expresión desregulada de receptores activadores de NK en células NK circulantes. La figura muestra la distribución de dispersión de varios receptores de activación de NK (indicados en la figura) perfil de expresión en células NK circulantes. Hay tres grupos principales de muestras, donantes sanos (cuadrados negros), pacientes sin evidencia de enfermedad (NED, triángulos verticales negros) y pacientes con evidencia de enfermedad (WED, triángulos inversos negros). Cada forma individual representa una muestra única del mismo grupo. El eje Y denota el porcentaje de células NK circulantes con receptor positivo. Las líneas horizontales indican el valor medio del grupo, que se indica numéricamente a continuación. La prueba t paramétrica no paramétrica se usó para comparar entre diferentes grupos, como se indica en cada gráfico. * denota valor $P < 0,05$, ** denota valor $P < 0,01$.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ESPECÍFICAS DE LA INVENCION

[0022] La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos para el diagnóstico de melanoma.

[0023] Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, es de entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de varias maneras.

[0024] La Sociedad Americana del Cáncer estima que el riesgo de por vida de que una persona desarrolle cáncer es de 1 en 2 hombres y 1 de cada 3 para las mujeres. El desarrollo del cáncer, aunque todavía no se comprende completamente, puede mejorarse como resultado de una variedad de factores de riesgo. Por ejemplo, la exposición a factores ambientales (p. ej., humo de tabaco) podría desencadenar modificaciones en ciertos genes, iniciando así el desarrollo del cáncer. Alternativamente, estas modificaciones genéticas pueden no requerir una exposición a factores ambientales para volverse anormales. De hecho, ciertas mutaciones (p. ej., deleciones, sustituciones, etc.) pueden heredarse de generación en generación, impartiendo así a un individuo una predisposición genética para desarrollar cáncer.

[0025] Actualmente, las tasas de supervivencia para muchos cánceres están en aumento. Una razón para este éxito es la mejora en la detección de cáncer en una etapa en la que el tratamiento puede ser efectivo. De hecho, se ha observado que uno de los medios más efectivos para sobrevivir al cáncer es detectar su presencia lo antes posible. Según la Sociedad Estadounidense del Cáncer, la tasa de supervivencia relativa para muchos tipos de cáncer aumentaría en aproximadamente un 15% si las personas participaran en exámenes de detección de cáncer regulares. Por lo tanto, cada vez es más útil desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico para detectar el cáncer preferiblemente antes de que se desarrolle o en una etapa de desarrollo lo más temprana posible.

[0026] CEACAM1 soluble ha sido previamente sugerido como un marcador tumoral, especialmente para melanoma. Curiosamente, CEACAM1 soluble también es evidente en el suero de individuos sanos, aunque a niveles más bajos.

[0027] El presente inventor ha descubierto que CEACAM1 se expresa en linfocitos de sangre periférica (PBL) de individuos de melanoma afectada, mientras que la expresión de esta proteína en los PBL de individuos sanos no se encuentra (indetectable usando FACS).

[0028] Este hallazgo sugiere que la expresión de pruebas CEACAM1 en linfocitos aislados se puede utilizar de manera efectiva en el diagnóstico de melanoma con lecturas erróneamente positivas reducidas.

[0029] Así, según un aspecto de la invención, se proporciona un método de diagnóstico de melanoma, el método comprende la determinación de un nivel de CEACAM1 en aislado linfocitos de sangre periférica (PBL) de un sujeto en necesidad del mismo, en una regulación al alza de dicho nivel de CEACAM1 por encima de un umbral predeterminado es indicativo de cáncer en dicho sujeto.

[0030] Tal como se utiliza aquí, el término "diagnosticar" se refiere a determinar la presencia o ausencia de una patología, la clasificación de una patología o un síntoma, la determinación de una severidad de la patología, el seguimiento de la progresión de la patología, la previsión de un resultado de una patología y/o perspectivas de recuperación. El término diagnóstico también se refiere, en algunas realizaciones del mismo, al cribado. La detección del cáncer puede conducir a un diagnóstico temprano en casos específicos. El diagnóstico temprano puede conducir a una vida más larga.

[0031] Como se usa aquí la frase "sujeto en necesidad del mismo" se refiere a un sujeto humano que está en riesgo de tener melanoma [por ejemplo, un sujeto genéticamente predispuesto, un sujeto con la historia médica y/o familiar de melanoma, un sujeto que ha sido expuesto a agentes carcinógenos, peligro ocupacional, peligro ambiental] y/o un

sujeto que exhibe sospechosos signos clínicos de melanoma. Adicional o alternativamente, el sujeto en necesidad del mismo puede ser un sujeto humano sano de someterse a una rutina de bienestar chequeo.

[0032] Como se usa en el presente documento, el término "CEACAM1" se refiere al ARNm o producto proteico del gen CEACAM1, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de CEACAM1 incluyen, pero no se limitan a, NM_001184816.1 GI: 296317313 (SEQ ID NO: 5), NM_001184813. 1 GI: 296317304 (SEQ ID NO: 6), NM_001184815.1 GI: 296317311 (SEQ ID NO: 7), NM_001024912.2 GI: 296317301 (SEQ ID NO: 8), NM_001712.4 GI: 296317298 (SEQ ID NO : 9). Las secuencias de proteínas de CEACAM1 incluyen, pero no se limitan a, AAH24164.1 (SEQ ID NO: 10), AAH14473.1 (SEQ ID NO: 11), NP_001171745.1 (SEQ ID NO: 12), NP_001171742.1 (SEQ ID NO: 13), NP_001171744.1 (SEQ ID NO: 14), P13688.2 (SEQ ID NO: 15).

[0033] Como se usa en el presente documento, la frase "linfocitos de sangre periférica" se refiere a una muestra tomada de la sangre circulante como oposición a las células sanguíneas secuestradas dentro del sistema linfático, bazo, hígado, o médula ósea. El término se refiere a linfocitos granulados grandes y linfocitos pequeños. Los linfocitos granulados grandes incluyen células asesinas naturales (células NK). Los linfocitos pequeños consisten en células T y células B.

[0034] Tal como se utiliza aquí, el término "aislado" se refiere a aislados del medio ambiente natural. Según una realización específica, el término se refiere a suero purificado, es decir, sin plasma.

[0035] Muestras de células de sangre periférica son típicamente tomadas usando una jeringa con una aguja.

[0036] Los métodos de procesamiento de muestras de células sanguíneas periféricas son conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la sección de Ejemplos a continuación.

[0037] Se apreciará que la determinación del nivel de CEACAM1 en la sangre periférica se realiza *ex vivo* (en una muestra derivada del sujeto).

[0038] Como se usa en el presente documento, la frase "nivel de CEACAM1" se refiere al grado de expresión génica y/o actividad del producto génico (por ejemplo, inhibición de la actividad destructora de NK como se muestra en las Figuras 2A-C) del gen CEACAM1 en la muestra biológica. En consecuencia, el nivel de CEACAM1 se puede determinar a nivel de aminoácidos utilizando métodos de detección de proteínas.

[0039] Por lo tanto, el nivel de la secuencia de aminoácidos CEACAM1 (proteína CEACAM1) se puede determinar usando un anticuerpo específico CEACAM1 mediante la formación de un inmunocomplejo [es decir, Un complejo formado entre el CEACAM1 antígeno (una secuencia de ácido amino CEACAM1) presente en la muestra biológica y el anticuerpo específico CEACAM1].

[0040] El inmunocomplejo de la presente invención se puede formar en una variedad de temperaturas, concentración de sal y valores de pH que puede variar dependiendo del método y de la muestra biológica usada y aquellos de habilidades en la técnica son capaces de ajustar las condiciones adecuadas para la La formación de cada inmunocomplejo.

[0041] El término "anticuerpo" como se usa en esta invención incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, Fv o moléculas de dominio único, tales como VH y VL a un epítipo de un antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen de la siguiente manera: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, se puede producir mediante la digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; (5) Anticuerpo de cadena simple ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unida por un conector de polipéptido adecuado como una molécula de cadena única genéticamente fusionada; y (6) Los anticuerpos de dominio único están compuestos por un solo dominio VH o VL que exhiben suficiente afinidad por el antígeno.

[0042] Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como sus fragmentos, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988, incorporado aquí como referencia).

[0043] Los fragmentos de anticuerpo según la presente invención se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en E. coli o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otras de expresión de proteínas de sistemas) de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de

anticuerpos se pueden obtener por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir mediante la escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos son descritos, por ejemplo, por Goldenberg, la patente de EE.UU. Nos. 4,036.945 y 4.331.647, y las referencias contenidas en ellas, cuyas patentes se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Ver también Porter, RR [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]. También se pueden usar otros métodos para escindir anticuerpos, como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligeras y pesadas, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

[0044] Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al. [Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 69: 2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por productos químicos tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un conector peptídico. Las proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como E. coli. Las células huésped recombinantes sintetizan una sola cadena de polipéptidos con un péptido conector que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv están descritos, por ejemplo, por Whitlow y Filpula, Métodos 2: 97-105 (1991); Bird et al. al, Science 242: 423-426 (1988); Pack et al, Bio/Technology 11: 1271-1277 (1993); y la patente de EE.UU. No. 4.946.778, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad

[0045] Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de las células productoras de anticuerpos. Ver, por ejemplo, Larrick y Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)].

[0046] Los anticuerpos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de expresión en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)). De manera similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Ante la exposición, se observa la producción de anticuerpos, que se asemeja mucho a la observada en humanos en todos los aspectos, incluida la reordenación de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10,: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1) 996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, pasante. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).

[0047] Según el método de este aspecto de la presente invención, una cantidad de la formación de inmunocomplejos es indicativa de un diagnóstico del cáncer. Se pueden usar varios métodos para detectar la formación del inmunocomplejo CEACAM1 de la presente invención y los expertos en la materia son capaces de determinar qué método es adecuado para cada inmunocomplejo.

[0048] Los anticuerpos anti CEACAM1 son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en la sección de Ejemplos que sigue (véase también la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20090181403, que enseña anticuerpos policlonales o monoclonales para CEACAM1, incorporados aquí como referencia en su totalidad). Los anticuerpos específicos de CEACAM1 ejemplares incluyen: monoclonal de ratón [29H2] para CEACAM1; Ratón monoclonal [GM8G5] a CEACAM1 (GM8G5 reconoce el dominio CEACAM1 A2 humano); Número de anticuerpo CEACAM1 2037,00,02 (de Strategic Diagnostics Inc) que une los aminoácidos CEACAM1 35-134; el anticuerpo 4D1/C2 específico de CEACAM1; mAb anti-CEACAM1 5F4; mAb anti-CEACAM1 Kat4c; o cualquier combinación o derivado de los mismos. El agente de unión CEACAM1 también puede ser un miembro de la familia de proteínas CEA. Otro anticuerpo que puede usarse de acuerdo con las presentes enseñanzas es el que tiene las CDR del anticuerpo producido a partir de la célula de hibridoma que se ha depositado con el Número de Acceso ATCC PTA-9974.

[0049] El anticuerpo CEACAM1 utilizado en el inmunocomplejo de la presente invención puede marcarse usando métodos conocidos en la técnica. Se apreciará que los anticuerpos marcados pueden ser anticuerpos primarios (es decir, que se unen a antígeno específico, por ejemplo, un antígeno-CEACAM1 específico) o anticuerpos secundarios (por ejemplo, anticuerpos anti conejo de cabra marcados, anticuerpos anti humanos de ratón marcados) que se unen a los anticuerpos primarios. El anticuerpo se puede conjugar directamente a una etiqueta o se puede conjugar a una

enzima.

- 5 **[0050]** Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser etiquetados con fluorescencia (usando un colorante fluorescente conjugado con un anticuerpo), radiomarcado (usando radiomarcado por ejemplo, ¹²⁵I, anticuerpos), o conjugado a una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) y se usa junto con un sustrato cromogénico para producir una reacción colorimétrica. Los sustratos cromogénicos utilizados por los anticuerpos conjugados con enzimas de la presente invención incluyen, entre otros, AEC, rojo rápido, sustrato ELF-97 [2-(5'-cloro-2-fosforiloxifenil)-6-cloro-4(3H)-quinazolinona], p-nitrofenil fosfato (PNPP), fenoltaleína difosfato y ELF 39-fosfato, BCIP/INT, Vector Red (VR), salmón y magenta fosfato (Avivi C., et al., 1994, J Histochem. Cytochem. 1994; 42: 551-4) para la enzima fosfatasa alcalina y Nova Red, diaminobencidina (DAB), sustrato Vector (R) SG, sustrato quimioluminiscente a base de luminol para la enzima peroxidasa. Estos sustratos enzimáticos están disponibles comercialmente en Sigma (St Louis, MO, EE.UU.), Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EE.UU.), Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, EE.UU.), Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA), EE.UU.), Dako Cytomation (Dinamarca).
- 15 **[0051]** La detección del inmunocomplejo CEACAM1 en PBC se puede realizar usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), análisis de inmunotransferencia Western y de inmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación (IP) con el uso opcional de cuentas magnéticas o por un enfoque basado en el peso molecular.
- 20 **[0052]** Para la transferencia Western, las proteínas se extraen de una muestra de células y se someten a electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE) y transferencia a una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa o PVDF). La membrana luego interactúa con un anticuerpo CEACAM1 que puede marcarse directamente o someterse adicionalmente a un anticuerpo secundario marcado. La detección puede ser por autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite tanto la cuantificación de una cantidad de sustrato como la determinación de su identidad mediante una posición relativa en la membrana que es indicativa de una distancia de migración en el gel de acrilamida durante la electroforesis.
- 25 **[0053]** En caso de que la concentración del antígeno en la muestra biológica es baja, la detección del antígeno (CEACAM1 secuencia de aminoácidos) se puede realizar por inmunoprecipitación (IP). Para el análisis de inmunoprecipitación, el anticuerpo CEACAM1 puede interactuar directamente con una muestra (p. ej., lisado celular) que incluye CEACAM1 y el complejo formado puede detectarse adicionalmente usando un anticuerpo secundario conjugado con perlas (p. ej., si el anticuerpo CEACAM1 es un anticuerpo monoclonal de ratón, el anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo anti-ratón conjugado, por ejemplo, con perlas de Sepharose). Las perlas pueden precipitarse luego por centrifugación, después de lo cual las proteínas precipitadas (p. ej., anticuerpos CEACAM1 y anti CEACAM1) pueden separarse de las perlas (p. ej., usando desnaturalización a 95 ° C) y someterse a un análisis de transferencia Western usando el CEACAM1 específico anticuerpos. Alternativamente, el anticuerpo anti-CEACAM1 y el anticuerpo secundario conjugado con perlas pueden agregarse a la muestra biológica que contiene el antígeno (CEACAM1) para formar de este modo un inmunocomplejo, seguido de análisis de transferencia Western con anticuerpos anti-CEACAM1.
- 30 **[0054]** El análisis FACS permite la detección de antígenos presentes en las membranas celulares tales como CEACAM1. En resumen, los anticuerpos específicos de CEACAM1 están unidos a los fluoróforos y la detección se realiza mediante una máquina de clasificación celular que lee la longitud de onda de la luz emitida por cada célula a medida que pasa a través de un haz de luz. Este método puede emplear dos o más anticuerpos simultáneamente.
- 35 **[0055]** El nivel de CEACAM1 puede ser también determinado usando ELISA. Brevemente, una muestra que contiene el antígeno CEACAM1 se fija a una superficie tal como un pozo de una placa de microtitulación. Se aplica un anticuerpo específico de antígeno (un anticuerpo CEACAM1) acoplado a una enzima y se deja que se una al antígeno. La presencia del anticuerpo se detecta y cuantifica mediante una reacción colorimétrica que emplea la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas comúnmente empleadas en este método incluyen peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. Si está bien calibrado y dentro del rango lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producido. Generalmente se emplea un estándar de sustrato para mejorar la precisión cuantitativa.
- 40 **[0056]** El nivel de CEACAM1 puede ser también determinado usando el radio-inmunoensayo (RIA). En una versión, este método implica la precipitación del antígeno deseado (CEACAM1) con un anticuerpo específico y una proteína de unión a anticuerpos radiomarcados (p. ej., proteína A marcada con I¹²⁵) inmovilizada en un vehículo precipitable tal como perlas de agarosa. El número de recuentos en el precipitado es proporcional a la cantidad de antígeno.
- 45 **[0057]** En una versión alternativa de la RIA, un antígeno marcado y una proteína de unión del anticuerpo no marcado se emplean. Se agrega una muestra que contiene una cantidad desconocida de antígeno en cantidades variables. La disminución en los recuentos precipitados del antígeno marcado es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra añadida.
- 50 **[0058]** El nivel de CEACAM1 puede ser también determinado usando enfoque basado en el peso molecular. Dado que el inmunocomplejo exhibe un peso molecular más alto que sus componentes, también se pueden emplear
- 55
- 60
- 65

métodos capaces de detectar dicho cambio en el peso molecular. Por ejemplo, el inmunocomplejo puede detectarse mediante un ensayo de retardo en gel. Brevemente, un gel de acrilamida no desnaturalizante se carga con muestras. Un cambio en el tamaño (peso molecular) del producto proteico en comparación con sus componentes es indicativo de la presencia de un inmunocomplejo. Tal cambio a un peso molecular más alto se puede ver usando una tinción de proteína no específica como la tinción de plata o la tinción azul de Commassie.

[0059] Se apreciará que el análisis de una cantidad de CEACAM1 en los CNS puede efectuarse también en el nivel de polinucleótido. Los métodos de detección de ARN se pueden realizar usando un polinucleótido aislado (por ejemplo, una sonda de polinucleótidos, una sonda/cebador de oligonucleótidos) capaz de hibridarse con una secuencia de ácido nucleico CEACAM1 tal como el transcrito CEACAM1 establecido por NM_001184816.1 GI: 296317313 (SEQ ID NO : 5), NM_001184813.1 GI: 296317304 (SEQ ID NO: 6), NM_001184815.1 GI: 296317311 (SEQ ID NO: 7), NM_001024912.2 GI: 296317301 (SEQ ID NO: 8), NM_001712.4 GI : 296317298 (SEQ ID NO: 8). Los ejemplos para tales secuencias de sonda/cebador de oligonucleótidos se exponen en SEQ ID NOs: 1-3. Dicho polinucleótido puede tener cualquier tamaño, como un polinucleótido corto (por ejemplo, de 15-200 bases), un polinucleótido intermedio de 100-2000 bases y un polinucleótido largo de más de 2000 bases.

[0060] La sonda de polinucleótido aislado utilizado por la presente invención puede ser cualquier molécula de ARN marcada directa o indirectamente [por ejemplo, oligonucleótido de ARN (por ejemplo, de 17-50 bases), una molécula de ARN transcrita *in vitro*], molécula de ADN (p. ej., oligonucleótido, p. ej., 15-50 bases, molécula de ADNc, molécula genómica) y/o un análogo de la misma [p. ej., ácido nucleico peptídico (PNA)] que es específico de la transcripción de ARN CEACAM1 de la presente invención.

[0061] Los oligonucleótidos diseñados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención pueden generarse de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, tal como síntesis enzimática o síntesis en fase sólida. El equipo y los reactivos para ejecutar la síntesis en fase sólida están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Applied Biosystems. También se puede emplear cualquier otro medio para tal síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está dentro de las capacidades de un experto en la materia y puede lograrse mediante metodologías establecidas como se detalla, por ejemplo, en "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988) y "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984) utilizando química en fase sólida, por ejemplo, cianoetil fosforamidita seguida de desprotección, desalación y purificación mediante, por ejemplo, un método automatizado de tritilo o HPLC.

[0062] El polinucleótido aislado utilizado por la presente invención se puede marcar directa o indirectamente utilizando una molécula marcada o con etiqueta. Dichos marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes (p. ej., Fluoresceína o Texas Red), molécula radioactiva (p. ej., ^{32}P - γ -ATP o ^{32}P - α -ATP) y sustratos cromogénicos [p. ej., Fast Red, BCIP/INT, disponible en (ABCAM, Cambridge, MA)]. El marcado directo se puede lograr mediante la conjugación covalente de una molécula marcadora con el polinucleótido (p. ej., usando síntesis en fase sólida) o mediante la incorporación mediante polimerización (p. ej., usando una reacción de transcripción *in vitro* o etiquetado aleatorio). El marcado indirecto puede lograrse conjugando o incorporando covalentemente al polinucleótido una molécula de etiqueta no marcada (por ejemplo, digoxigenina o biotina) y posteriormente sometiéndolo a una molécula marcada (por ejemplo, anticuerpo anti-Digoxigenina o estreptavidina) capaz de reconocer específicamente la etiqueta no marcada.

[0063] Los polinucleótidos descritos anteriormente se pueden emplear en una variedad de métodos de detección de ARN tal como el norte de análisis de transferencia, que se transcribe-inversa PCR (RT-PCR) [por ejemplo, una RT-PCR semi-cuantitativa, RT-PCR cuantitativa usando, por ejemplo, el Light Cycler™ (Roche)], hibridación de ARN *in situ* (ARN-ISH), tinción de RT-PCR *in situ* [por ejemplo, como se describe en Nuovo GJ, et al. 1993, localización intracelular de ADNc de hepatitis C amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Soy J Surg Pathol. 17: 683-90, y Komminoth P, et al. 1994, Evaluación de métodos para la detección del virus de la hepatitis C en biopsias hepáticas de archivo. Comparación de histología, inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y RT-PCR *in situ*. Pathol Res Pract., 190: 1017-25] y análisis de micromatrices de oligonucleótidos [por ejemplo, usando el micromatriz de Affymetrix (Affymetrix®, Santa Clara, CA)].

[0064] Como se ha mencionado, un nivel de CEACAM1 en una muestra PBC por encima de un umbral predeterminado es indicativo del cáncer.

[0065] El "umbral predeterminado" puede determinarse experimentalmente mediante la comparación de muestras de PBC normales (por ejemplo, muestras obtenidas de sujetos sanos, no afectados con cáncer) a muestras PBC derivadas de sujetos conocidos por tener la carcinogénesis tal como CRC. Preferiblemente, se analiza un número estadísticamente significativo de muestras.

[0066] Se apreciará que la presencia de melanoma se puede validar adicionalmente usando ensayos adicionales. Por ejemplo, en caso de que el nivel de CEACAM1 detectado en una muestra de PBC de un sujeto esté por encima de un umbral predeterminado, ensayos adicionales, tales como ensayos estándar Gold, que incluyen, entre otros, histología,

imágenes, marcadores moleculares, análisis de sangre seguidos de evaluaciones histológicas (incluida la inmunotinción CEACAM1), se puede realizar el "ABCDE" y la biopsia de piel.

5 **[0067]** Una vez que se obtienen los resultados del sujeto es informado de los resultados de la prueba, es decir, la presencia o ausencia de melanoma y tratamientos adecuados pueden ser iniciados.

10 **[0068]** Las composiciones de diagnóstico pueden, si se desea, presentarse en un artículo de fabricación, por ejemplo, kit, tal como un kit FDA aprobado, que puede contener reactivos de diagnóstico y las instrucciones de uso.. El kit también puede ser acomodado por un aviso asociado con el contenedor en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o el uso humano o veterinario.

15 **[0069]** Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "incluyendo, pero no limitado a".

[0070] El término "que consiste en" significa "que incluye y se limitado a".

20 **[0071]** El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura pueden incluir adicionales ingredientes, pasos y/o partes, pero sólo si los ingredientes adicionales, pasos y/o partes no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

25 **[0072]** Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una", "el" y "ella" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

30 **[0073]** A lo largo de esta solicitud, diversas realizaciones de esta invención se pueden presentar en un formato de intervalo. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un rango como del 1 al 6 ha revelado específicamente subrangos tales como del 1 al 3, del 1 al 4, del 1 al 5, del 2 al 4, del 2 al 6, del 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

35 **[0074]** Siempre que un intervalo numérico se indica en el presente documento, se entiende que incluye cualquier numeral citado (fraccionado o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "rango/rangos entre" un primer número de indicación y un segundo número de indicación y "rango/rangos de" un primer número de indicación "a" un segundo número de indicación se usan indistintamente en el presente documento y están destinados a incluir el primer y el segundo número indicado y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

40 **[0075]** Tal como se utiliza aquí, el término "método" se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada incluyendo, pero no limitado a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos por, o fácilmente desarrollados a partir de maneras conocidas, medios, técnicas y procedimientos de profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

45 **[0076]** Tal como se utiliza aquí, el término "tratar" incluye abrogar, sustancialmente inhibir, retrasar o invertir la progresión de una afección, sustancialmente mejorar los síntomas clínicos o estéticos de una condición o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una condición.

50 **[0077]** Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de distintos modos de realización, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuada en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

55 **[0078]** Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se delinearon anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

60 **[0079]** Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

[0080] En general, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN recombinante moleculares, bioquímicas, microbiológicas y. Dichas técnicas se explican a fondo en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías descritas en U.S. Pat. Nos 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and C o., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura científica y de patentes, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4,034,074; 4,098.876; 4.879.219; 5,011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, MJ, ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se establecieran completamente en este documento. Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos allí conocidos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información aquí contenida se incorpora aquí como referencia.

25 **PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

Pacientes y controles

[0081] Se incluyeron pacientes con melanoma maligno cutáneo patológicamente verificado en todas las etapas AJCC de la enfermedad. No hubo criterios de exclusión. Los pacientes se clasificaron clínicamente en dos grupos: a) pacientes sin evidencia de enfermedad (NED) en el momento de la toma de muestras de sangre que se subdividieron en bajo riesgo de recurrencia (AJCC estadio I o II) y alto riesgo de recurrencia (estadio AJCC III o IV); b) pacientes con evidencia de enfermedad activa (DEM) en el momento del muestreo de sangre, que fueron subcategorizados de acuerdo con los criterios del AJCC. Los pacientes con NED de alto riesgo (estadios AJCC III y IV) han recibido terapia previa que produjo regresión de la enfermedad. Todos los controles normales estaban en excelente estado de salud en el momento del estudio. Todos los pacientes con melanoma y voluntarios sanos dieron su consentimiento informado por escrito antes de su participación en este estudio. Este estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Centro Médico Sheba.

40 **Características de muestras**

[0082] Las muestras de sangre se obtuvieron de individuos sanos y pacientes por veno-punción (> 3 ml) y estándar de los procedimientos de manipulación. Los linfocitos de sangre periférica se purificaron usando un gradiente de densidad y se congelaron profundamente en nitrógeno líquido. Las muestras anónimas (marcadas solo con número de identificación) se vincularon solo a datos clínico-patológicos.

Diseño del estudio

[0083] Se obtuvo sangre en la clínica de melanoma sin selección de casos. Ninguno de los pacientes se sometió a cirugía cerca del momento del muestreo de sangre. El estudio fue retrospectivo: se obtuvo una sola muestra de sangre de todos los pacientes, se congeló y se analizó en un punto posterior, técnicamente conveniente. Cada muestra se probó dos veces independientes en repeticiones triplicadas. El seguimiento en este estudio comenzó desde el momento del muestreo de sangre. El tiempo medio de seguimiento fue de 12 meses en todos los grupos, excepto en los pacientes con WED en estadio IV-M1c, debido a la muerte de algunos de los pacientes poco después del muestreo de sangre (Tabla 1). Los criterios de valoración clínicos examinados fueron el período libre de enfermedad (DFP) para pacientes con NED y la supervivencia para pacientes con WED.

Anticuerpos

[0084] Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas CEACAM incluidas en este trabajo fueron: anticuerpos monoclonales murinos anti-humanos CEACAM1 NC8 [Albarran-Somoza B, Franco-Topete R, Delgado-Rizo V et al (2006) CEACAM1 en cervical cáncer y lesiones precursoras : asociación con la infección por el virus del papiloma humano. J Histochem Cytochem. 54: 1393-1399], CEACAM1 murino antihumano, 5, 6, 8 anticuerpo monoclonal Kat4c (Dako, Glustrup Dinamarca) y anticuerpos policlonales de conejo purificados CEACAM1, 5, 6 anticuerpos (Dako, Glustrup Dinamarca). Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados : anti CD3-FITC humano (IQ); anti-humano CD56-PE/Cy5.5 (eBioscience); anti humano NKp46-APC (eBioscience); anti humano NKp30-APC

(eBioscience); anti-humano CD16-PE (eBioscience); anti humano NKG2D-APC (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), NC8 biotinilado y anticuerpos policlonales de conejo biotinilados CEACAM1, 5, 6 humanos. Los reactivos secundarios incluyeron fragmentos F(ab')₂ conjugados con PE de IgG de cabra anti-Fc humana (Jackson ImmunoResearch); FIT (ab')₂ conjugados con FITC de IgG de cabra anti ratón-Fc (ICN) y estreptavidina conjugada con PE (Jackson ImmunoResearch). La biotinilación de anticuerpos se realizó con SS biotina (Chemicon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Citometría de flujo

[0085] La unión de anticuerpos a las células se probó en procedimientos de citometría de flujo estándar como se informó anteriormente [Markel G, Seidman R, Stern N et al (2006). La inhibición de las funciones efectoras de linfocitos infiltrantes de tumores humanos por las interacciones de la molécula 1 de adhesión de células carcinoembrionarias homofílicas. *J Immunol* 177: 6062-6071; Markel G, Seidman R, Cohen Y et al 2009 Feb; 126 (2): 186-200. Epub 2008 Jun 13 Expresión dinámica de CEACAM1 protector en células de melanoma durante el ataque inmune específico. Los PBL se caracterizan por tener un valor de dispersión frontal y lateral pequeño en la citometría de flujo, y se cerraron en consecuencia. Las células se tiñeron con una mezcla de anticuerpos, CD3 incluidos (marcador de células T), CD56 (marcador NK) y un anticuerpo para CEACAM1 (por ejemplo, Kat4c). Las células T se definieron como linfocitos CD3-positivos CD56-negativos (dentro de la puerta de dispersión frontal y lateral descrita anteriormente). Las células NK se definen como CD3-negativo linfocitos CD56-positivo (dentro de la puerta hacia adelante y dispersión lateral descrito anteriormente).

RESULTADOS

Porcentaje inusualmente alto de células NK y T CEACAM1 positivas en la sangre periférica de pacientes con melanoma

[0086] El patrón de expresión CEACAM1 era determinado en células NK y T bloqueadas derivadas de linfocitos de sangre periférica de donantes sanos y pacientes con melanoma. El porcentaje medio de células NK positivas para CEACAM1 en donantes sanos fue del 15% (Figura 1a). Se observó una proporción significativamente mayor de células NK positivas para CEACAM1 (33%) en pacientes con NED, pero la proporción más alta (45%) se observó en pacientes con WED (Figura 1a). Del mismo modo, se observó un aumento significativo en la proporción media de células T positivas para CEACAM1 (31%) en pacientes con WED (Figura 1b). El porcentaje de ceacam + en las células t de NED fue inferior a 5. Se pudo observar una correlación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de CEACAM1 por las células NK y T en pacientes con WED (Spearman $r = 0.5$, valor de $P < 0.05$). Se observó una tendencia similar, aunque más leve, en pacientes con NED, sin alcanzar significación estadística (r de Spearman = 0.267, valor de $P = 0.082$). No hubo correlación entre los porcentajes de CEACAM1 en las células T o NK con la concentración sérica de CEACAM1. En conclusión, aunque tanto las concentraciones solubles de CEACAM1 como la expresión de CEACAM1 en los linfocitos generalmente están vinculadas a la actividad de la enfermedad, no están conectadas directamente entre sí.

[0087] De hecho, cuando los pacientes con WED se clasificaron en DOD (muerto de enfermedad) y AWD (vivo pacientes con enfermedad), la proporción media de células NK positivas para CEACAM1 entre pacientes con DOD (51,9%) fue significativamente mayor que en pacientes con AWD (34,4%) (Figura 1c). Sin embargo, no hubo una correlación clara entre el porcentaje de expresión de CEACAM1 y el tiempo de muerte entre estos pacientes (datos no mostrados). No hubo diferencia en el porcentaje de células T positivas para CEACAM1 entre pacientes con DOD y AWD (Figura 1d).

Expresión de CEACAM1 mejorada es funcional e inhibe la lisis mediada por NK

[0088] Los linfocitos de sangre periférica se derivaron de pacientes con melanoma (pacientes ejemplares 38 y 71) o donantes sanos (Figura 2a). La inhibición mediada por CEACAM1 de linfocitos frescos se probó en ensayos de citotoxicidad natural. Los 721.221 sensibles a NK (.221/Mock) y 721.221 transfectados de manera estable con la proteína CEACAM1 (.221/CEACAM1) se usaron como células diana. La actividad destructora natural de las células.221 se observó claramente con linfocitos derivados de todas las fuentes (Figura 2b). Sorprendentemente, se observó una inhibición moderada, aunque reproducible y significativa de la muerte de las células.221/CEACAM1 solo con los linfocitos derivados del paciente (Figura 2b). No se midió una inhibición similar con los linfocitos derivados de donantes sanos (Figura 2b). Se observaron resultados similares con linfocitos derivados de otros pacientes (datos no mostrados), así como en experimentos de lisis redirigidos realizados con el compromiso concurrente de CEACAM1 (datos no mostrados). Estos resultados muestran que la expresión mejorada de CEACAM1 en las células NK circulantes es funcional y puede exponer el sistema inmunitario del paciente a la inhibición mediada por CEACAM1.

Sueros de los pacientes no inducen la expresión CEACAM1 en los linfocitos

[0089] Linfocitos de sangre periférica frescos de donantes sanos se incubaron durante 48 horas en medio de cultivo o suero derivado ya sea de: donantes sanos, los pacientes con bajo porcentaje de linfocitos CEACAM1-positivo o pacientes con alto porcentaje de linfocitos positivos para CEACAM1. CEACAM1 se analizó en células de linfocitos

activados. No hubo diferencias significativas en la expresión de CEACAM1 entre los diferentes tratamientos en células CD56 (+) o CD56 (-) (**Figura 2c**). Estos experimentos sugieren que la alta expresión de CEACAM1 en linfocitos observada en pacientes con melanoma probablemente no se deba a factores solubles sistémicos.

5 **El fenotipo de las células NK circulantes en pacientes con melanoma es generalmente anormal.**

10 **[0090]** Las células NK de sangre periférica se tiñeron para la expresión de varios receptores destructores, incluyendo NKG2D, NKp46, CD16 y NKp30. Se observó una disminución notable en los perfiles de expresión de NKp46, CD16 y NKp30, pero no en NKG2D. Específicamente, NKp46 se redujo significativamente entre todos los pacientes, en comparación con los donantes sanos, pero no hubo diferencias significativas entre los pacientes con NED y WED. Se observó una disminución significativa de CD16 y NKp30 entre los pacientes con WED, en comparación con los pacientes con NED y los donantes sanos. No hubo diferencias significativas entre los pacientes con NED y los donantes sanos en la expresión de estos receptores (Figura 3). Se identificó una correlación positiva estadísticamente significativa entre CD16, NKp30 y NKp46 y, adicionalmente, entre NKp46 y NKG2D (Tabla 1, a continuación). Una notable correlación negativa fue evidente entre la expresión de CEACAM1 y la expresión de todos los receptores de destrucción analizados, excepto NKG2D (Tabla 1). Estos resultados indican una irregularidad sistémica en el fenotipo de células NK, que no se limita solo a la expresión de CEACAM1.

20 **Tabla 1: Correlación entre la expresión CEACAM1 y receptores activadores de NK en pacientes con melanoma**
La correlación fue calculada con la prueba de Spearman. La tabla resume los valores R de Spearman entre cada par de parámetros. * denota el valor P < 0,05, ** denota el valor P < 0,01, *** denota el valor P < 0,001.

	NKG2D	NKp46	NKp30	CD16	CEACAM1	
25	-0,024	-0,270*	-0,437***	-0,328**	1	CEACAM1
	0,13	0,376**	0,414**	1	-0,328**	CD16
	0,072	0,353**	1	0,414**	-0,437***	NKp30
	0,351	1	0,353**	0,376**	-0,207*	NKp46
30	1	0,351**	0,13	0,13	-0,024	NKG2D

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 **[0091]**
- <110> Tel HaShomer Medical Research Infrastructure and Services Ltd. Markel, Gal
 - <120> UN MÉTODO DE DIAGNOSTICAR EL CÁNCER
 - 40 <130> 49350
 - <150> US 61/227,130
 - <151> 2009-07-21
 - 45 <160> 14
 - <170> PatentIn versión 3.5
 - <210> 1
 - 50 <211> 21
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial
 - <220>
 - 55 <223> Oligonucleótido de hebra única de ADN
 - <400> 1
 - gagtgtggc cctggtgct c 21
 - 60 <210> 2
 - <211> 17
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial

ES 2 753 986 T3

```

<220>
<223> Oligonucleótido de hebra única de ADN

5  <400> 2
   cgctggtcgc ttgcct   17

   <210> 3
   <211> 18
10  <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

   <220>
   <223> Oligonucleótido de hebra única de ADN

15  <400> 3
   ggtcctgagc tgccggtc   18

   <210> 4
20  <211> 3187
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens

   <400> 4
25

       aaagctctgg gccccagggg ggaggctcag cacagagagt ggaaaacagc agaggtgaca       60
       gagcagccgt gctcgaagcg ttcctggagc ccaagctctc ctccacaggt gaagacaggg       120
30  ccagcaggag acaccatggg gcacctctca gccccacttc acagagtgcg tgtaccctgg       180
       caggggcttc tgctcacagc ctacttcta accttctgga acccgcccac cactgcccag       240
       ctactactg aatccatgcc attcaatggt gcagagggga aggaggttct tctccttgtc       300
35  cacaatctgc cccagcaact ttttggttac agctggtaca aaggggaaag agtggatggc       360
       aaccgtcaaa ttgtaggata tgcaatagga actcaacaag ctaccccagg gcccgcaaac       420
       agcggtcgag agacaatata cccaatgca tccctgctga tccagaacgt caccagaat       480
40

45

50

55

60

```

ES 2 753 986 T3

5 gacacaggat tctacaccct acaagtcata aagtcagatc ttgtgaatga agaagcaact 540
 ggacagttcc atgtataccc ggagctgccc aagccctcca tctccagcaa caactccaac 600
 cctgtggagg acaaggatgc tgtggccttc acctgtgaac ctgagactca ggacacaacc 660
 tacctgtggt ggataaacia tcaagacctc ccggtcagtc ccaggctgca gctgtccaat 720
 10 ggcaacagga ccctcactct actcagtgtc acaaggaatg acacaggacc ctatgagtgt 780
 gaaatacaga acccagtgag tgcgaaccgc agtgaccag tcacctgaa tgtcacctat 840
 ggccccgaca cccccaccat ttccccttca gacacctatt accgtccagg ggcaaacctc 900
 agcctctcct gctatgcagc ctctaacca cctgcacagt actcctggct tatcaatgga 960
 15 acattccagc aaagcacaca agagctcttt atccctaaca tcaactgtgaa taatagtgga 1020
 tcctatacct gccacgcca taactcagtc actggctgca acaggaccac agtcaagacg 1080
 atcatagtca ctgataatgc tctaccacia gaaaatggcc tctcacctgg gccattgct 1140
 20 gccattgtga ttggagtgt ggccctgggt gctctgatag cagtagccct gccatgtttt 1200
 ctgcatttcg ggaagaccgg cagctcagga ccaactccat gaccaccta acaagatgaa 1260
 tgaagttact tattctacc tgaactttga agcccagcaa cccacacaac caacttcagc 1320
 25 ctccccatcc ctaacagcca cagaaataat ttattcagaa gtaaaaaagc agtaatgaaa 1380
 cctgtcctgc tcaactcagc gctgatgtat ttcaagtctc tcaccctcat cactaggaga 1440
 ttcccttccc ctgtaggggt agaggggtgg ggacagaaac aactttctcc tactcttct 1500
 30 tcctaatagg catctccagg ctgcctggtc actgcccctc tctcagtgtc aatagatgaa 1560
 agtacattgg gagtctgtag gaaaccaac cttcttctca ttgaaatttg gcaaagctga 1620
 ctttgggaaa gagggaccag aacttcccct ccttcccctc tttcccaacc tggacttggt 1680
 35 ttaaacttgc ctgttcagag cactcattcc tcccacccc cagtctgtgc ctatcactct 1740
 aattcggatt tgccatagcc ttgaggttat gtcccttccc attaatgaca tgtgccagga 1800
 aacaagagag agagaaagta aaggcagtaa tgcccttccc tatttctcca aagccttggt 1860
 40 tgaactcacc aaacacaaga aatcaata tataaccaat agtgaaatgc cacacctttg 1920
 tccactgtca gggttgtcta cctgtaggat cagggtctaa gcacctgggt gcttagctag 1980
 aataccacct aatcctctg gcaagcctgt cttcagagaa cccactagaa gcaactagga 2040
 45 aaatcacttg ccaaatcca aggcaattcc tgatgaaaa tgcaaaagca catatatggt 2100
 ttaatatctt tatggctctt gttcaaggca gtgctgagag ggaggggtta tagcttcagg 2160
 agggaaccag cttctgataa acacaatctg ctaggaactt gggaaaggaa tcagagagct 2220
 gcccttcagc gattatttaa attattgta aagaatacac aatttggggt attgggattt 2280
 50 ttctcctttt ctctgagaca ttccaccatt ttaatttttg taactgctta tttatgtgaa 2340
 aagggttatt tttacttagc ttagctatgt cagccaatcc gattgcctta ggtgaaagaa 2400
 accaccgaaa tccctcaggt cccttgggtc ggagcctctc aagatttttt ttgtcagagg 2460
 55 ctccaaatag aaaataagaa aaggttttct tcattcatgg ctgagagctag atttaactca 2520
 gtttctaggc acctcagacc aatcatcaac taccattcta ttccatggtt gcacctgtgc 2580
 attttctggt tgccccatt cactttgtca ggaaaccttg gcctctgcta aggtgtattt 2640
 60 ggtccttgag aagtgggagc accctacagg gacactatca ctcatgctgg tggcattggt 2700

ES 2 753 986 T3

	tacagctaga aagctgcaact ggtgctaatag ccccttgggg aaatggggct gtgaggagga	2760
	ggattataac ttaggcctag cctcttttaa cagcctctga aatttatctt ttcttctatg	2820
5	gggtctataa atgtatctta taataaaaag gaaggacagg aggaagacag gcaaatgtac	2880
	ttctcacca gtcttctaca cagatggaat ctcttgggg ctaagagaaa ggttttattc	2940
	tatattgctt acctgatctc atgttaggcc taagaggctt tctccaggag gattagcttg	3000
10	gagttctcta tactcagga cctcttcoag ggttttctaa cctgacacg gactgtgcat	3060
	actttccctc atccatgctg tgctgtgta ttttaattttt cctggctaag atcatgtctg	3120
	aattatgtat gaaaattatt ctatgttttt ataataaaaa taatatatca gacatcgaaa	3180
15	aaaaaaaa	3187

<210> 5

<211> 3240

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

25

30

35

40

45

50

55

60

ES 2 753 986 T3

	aaagctctgg gccccagga ggaggctcag cacagagagt ggaaaacagc agaggtgaca	60
	gagcagccgt gctcgaagcg ttctgggagc ccaagctctc ctccacaggt gaagacaggg	120
5	ccagcaggag acaccatggg gcacctctca gccccacttc acagagtgcg tgtaccctgg	180
	caggggcttc tgctcacagc ctcacttcta accttctgga acccgccac cactgcccag	240
	ctcactactg aatccatgcc attcaatggt gcagagggga aggaggttct tctccttgtc	300
10	cacaatctgc cccagcaact ttttggctac agctggtaca aaggggaaag agtggatggc	360
	aaccgtcaaa ttgtaggata tgcaatagga actcaacaag ctaccccagg gcccgcaaac	420
	agcggtcgag agacaatata cccaatgca tcctgctga tccagaacgt caccagaat	480
15	gacacaggat tctacaccct acaagtcata aagtcagatc ttgtgaatga agaagcaact	540
	ggacagtcc atgtataccc ggagctgccc aagccctcca tctccagcaa caactccaac	600
	cctgtggagg acaaggatgc tgtggccttc acctgtgaac ctgagactca ggacacaacc	660
20	tacctgtggt ggataaacia tcagagcctc ccggtcagtc ccaggctgca gctgtccaat	720
	ggcaacagga ccctcactct actcagtgtc acaaggaatg acacaggacc ctatgagtgt	780
	gaaatacaga acccagtgag tgcaaacgc agtgaccag tcaccttgaa tgtcacctat	840
25	ggccccgaca cccccacat ttccccctca gacacctatt accgtccag ggcaaacctc	900
	agcctctcct gctatgcagc ctctaacca cctgcacagt actcctggct tatcaatgga	960
	acattccagc aaagcacaca agagctcttt atccctaaca tcaactgtgaa taatagtgga	1020
30	tcctatacct gccacgcaa taactcagtc actggctgca acaggaccac agtcaagacg	1080
	atcatagtca ctgataatgc tctaccacia gaaaatggcc tctcacctgg ggccattgct	1140
	ggcattgtga ttggagtgt ggccctggtt gctctgatag cagtagccct ggcatgtttt	1200
35	ctgcatttcg ggaagaccgg cagggcaagc gaccagcgtg atctcacaga gcacaaacct	1260
	tcagtctcca accacactca ggaccactcc aatgaccac ctaacaagat gaatgaagtt	1320
	acttattcta ccctgaactt tgaagcccag caaccacac aaccaacttc agcctccca	1380
40	tcctaacag ccacagaaat aattattca gaagtaaaa agcagtaatg aaacctgtcc	1440
45		
50		
55		
60		

ES 2 753 986 T3

5 tgctcactgc agtgctgatg tatttcaagt ctctcacct catcactagg agattccttt 1500
 cccctgtagg ggtagagggg tggggacaga aacaacttcc tcctactcct ccttcctaata 1560
 aggcatctcc aggctgcctg gtcactgccc ctctctcagt gtcaatagat gaaagtacat 1620
 tgggagtctg taggaaaccc aaccttcttg tcattgaaat ttggcaaage tgactttggg 1680
 10 aaagagggac cagaacttcc cctcccctcc ccttttccca acctggactt gttttaaaact 1740
 tgcctgttca gagcactcat tccttcccac ccccagtcct gtcctatcac tctaattcgg 1800
 at ttgccata gccttgaggt tatgtccttt tccattaagt acatgtgcca ggaaacaaga 1860
 gagagagaaa gtaaaggcag taatgccttc tcctatttct ccaaagcctt gtgtgaactc 1920
 15 accaaacaca agaaaatcaa atatataacc aatagtgaaa tgccacacct ttgtccactg 1980
 tcagggttgt ctacctgtag gatcagggtc taagcacctt ggtgcttagc tagaatacca 2040
 cctaactcct ctggcaagcc tgtcttcaga gaaccacta gaagcaacta ggaaaatcac 2100
 20 ttgccaaaat ccaaggaat tcctgatgga aaatgcaaaa gcacatatat gttttaatat 2160
 ctttatgggc tctgttcaag gcagtgtga gaggagggg ttatagcttc aggagggaac 2220
 cagcttctga taaacacaat ctgctaggaa cttgggaaag gaatcagaga gctgcccttc 2280
 25 agcgattatt taaattattg ttaaagaata cacaatttgg ggtattgga ttttctcct 2340
 tttctctgag acattccacc attttaattt ttgtaactgc ttatttatgt gaaaagggtt 2400
 at ttttactt agcttagcta tgtcagccaa tccgattgcc ttaggtgaaa gaaaccaccg 2460
 30 aaatccctca ggtcccttgg tcaggagcct ctcaagattt tttttgtcag aggctccaaa 2520
 tagaaaataa gaaaagggtt tcttcattca tggctagagc tagatttaac tcagtttcta 2580
 ggcacctcag accaatcacc aactaccatt ctattocatg tttgcacctg tgcattttct 2640
 35 gtttgcccc attcactttg tcaggaaacc ttggcctctg ctaagggtga tttggtcctt 2700
 gagaagtggg agcacctac agggacacta tcactcatgc tgggtggcatt gtttacagct 2760
 agaaagctgc actggtgcta atgccccttg gggaaatggg gctgtgagga ggaggattat 2820
 40 aacttaggcc tagcctcttt taacagctc tgaatttat cttttcttct atgggggtcta 2880
 taaagtatc ttataataaa aaggaaggac aggaggaaga caggcaaatg tacttctcac 2940
 ccagtcttct acacagatgg aatctctttg gggctaagag aaaggtttta ttctatattg 3000
 45 cttacctgat ctcatgttag gcctaagagg ctttctccag gaggattagc ttggagttct 3060
 ctatactcag gtacctcttt cagggttttc taaccctgac acggactgtg catactttcc 3120
 ctcatocatg ctgtgctgtg ttatttaatt tttcctggct aagatcatgt ctgaattatg 3180
 50 tatgaaaatt attctatgtt ttataataa aaataatata tcagacatcg aaaaaaaaa 3240

<210> 6
 <211> 3333
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens

<400> 6

60

ES 2 753 986 T3

	aaagctctgg gccccagggg ggaggctcag cacagagagt ggaaaacagc agaggtgaca	60
5	gagcagccgt gctcgaagcg ttcttgagc ccaagctctc ctccacaggt gaagacaggg	120
	ccagcaggag acaccatggg gcacctctca gcccacttc acagagtgcg tgtaccctgg	180
	caggggcttc tgctcacagc ctcacttcta accttctgga acccgccac cactgccag	240
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		

ES 2 753 986 T3

5 ctcactactg aatccatgcc attcaatggt gcagagggga aggaggttct tctccttgtc 300
 cacaatctgc cccagcaact ttttggttac agctggtaca aaggggaaag agtggatggc 360
 aaccgtcaaa ttgtaggata tgcaatagga actcaacaag ctaccccagg gcccgcaaac 420
 agcggctcgag agacaatata ccccaatgca tccctgctga tccagaacgt caccagaat 480
 10 gacacaggat tctacaccct acaagtcata aagtcagatc ttgtgaatga agaagcaact 540
 ggacagtcc atgtataccc ggagctgccc aagccctcca tctccagcaa caactccaac 600
 cctgtggagg acaaggatgc tgtggccttc acctgtgaac ctgagactca ggacacaacc 660
 tacctgtggt ggataaacia tcagagcctc cgggtcagtc ccaggctgca gctgtccaat 720
 15 ggcaacagga cctcactct actcagtgtc acaaggaatg acacaggacc ctatgagtgt 780
 gaaatacaga acccagttag tgccaaccgc agtgaccag tcacctgaa tgtcacctat 840
 ggccccgaca cccccacat tccccctca gacacctatt accgtccagg ggcaaacctc 900
 20 agcctctcct gctatgcagc ctctaaccga cctgcacagt actcctggct tatcaatgga 960
 acattccagc aaagcacaca agagctcttt atccctaaca tcaactgtgaa taatagtgga 1020
 tctatacct gccacgcaa taactcagtc actggctgca acaggaccac agtcaagacg 1080
 25 atcatagtca ctgagagaca gaatctcacc atgttaccga ggctggactc gaactcctgg 1140
 gctcaagcaa tctctccatc tgtttcccaa agtgctgaga ttacagataa tgcctctacca 1200
 caagaaaatg gcctctcacc tggggccatt gctggcattg tgattggagt agtggccctg 1260
 30 gttgctctga tagcagtagc cctggcatgt tttctgcatt togggaagac cggcagggca 1320
 agcgaccagc gtgatctcac agagcacaaa cctcagtct ccaaccacac tcaggaccac 1380
 tocaatgacc cacctaacia gatgaatgaa gttacttatt ctaccctgaa ctttgaagcc 1440
 35 cagcaaccga cacaaccaac ttcagcctcc ccatccetaa cagccacaga aataatttat 1500
 tcagaagtaa aaaagcagta atgaaacctg tctgtctcac tgcagtgtg atgtatttca 1560
 agtctctcac cctcatcact aggagattcc tttcccctgt aggggtagag ggggtgggac 1620
 40 agaaacaact ttctcctact ctctctcct aataggcatc tccaggctgc ctggctcactg 1680
 cccctctctc agtgtcaata gatgaaagta cattgggagt ctgtaggaaa cccaaccttc 1740
 ttgtcattga aatttgcaa agctgacttt gggaaagagg gaccagaact tcccctcct 1800
 45 tccccttttc ccaacctgga ctgtgtttta acttgctgtg tcagagcact cattccttcc 1860
 caccocagc cctgtcctat cactctaatt cggatttgc atagccttga ggttatgtcc 1920
 tttccatta agtacctgtg ccaggaaca agagagagag aaagtaaagg cagtaatgcc 1980
 50 ttctcctatt tctccaaagc cttgtgtgaa ctacccaac acaagaaat caaatatata 2040
 accaatagtg aatgccaca cctttgtcca ctgtcagggg tgtctacctg taggatcagg 2100
 gtctaagcac cttggtgctt agctagaata ccacctaata cttctggcaa gcctgtcttc 2160
 55 agagaacca ctagaagcaa ctaggaaat cacttgccaa aatccaaggc aattcctgat 2220
 ggaaaatgca aaagcacata tatgttttaa tatctttatg ggctctgttc aaggcagtgc 2280
 tgagagggag gggttatagc ttcaggaggg aaccagcttc tgataaacac aatctgctag 2340
 60 gaacttggga aaggaatcag agagctgccc ttcagcgatt atttaaatta ttgttaaaga 2400
 atacacaatt tggggattg ggatttttct cctttctct gagacattcc accattttaa 2460

ES 2 753 986 T3

	tttttgtaac tgcttattta tgtgaaaagg gttatnttta cttagcttag ctatgtcagc	2520
5	caatccgatt gccttaggtg aaagaaacca ccgaaatccc tcaggtccct tggtcaggag	2580
	cctctcaaga ttttttttgt cagaggctcc aaatagaaaa taagaaaagg ttttcttcat	2640
	tcattggctag agctagattt aactcagttt ctaggcacct cagaccaatc atcaactacc	2700
10	attctattcc atgtttgcac ctgtgcattt tctgtttgcc cccattcaact ttgtcaggaa	2760
	accttggcct ctgctaaggt gtatttggtc cttgagaagt gggagcacc c tacagggaca	2820
	ctatcactca tgcctgggtgc attgtttaca gctagaaaagc tgcaactggtg ctaatgcccc	2880
15	ttggggaaat ggggctgtga ggaggaggat tataacttag gcctagcctc ttttaacagc	2940
	ctctgaaatt tatcttttct tctatgggggt ctataaatgt atcttataat aaaaaggaag	3000
	gacaggagga agacaggcaa atgtacttct caccagctct tctacacaga tggaaatctct	3060
20	ttggggctaa gagaaagggt ttattctata ttgcttacct gatctcatgt taggcctaaç	3120
	aggetttctc caggaggatt agcttggagt tctctatact caggtaacct tttcagggtt	3180
	ttctaaccct gacacggact gtgcatactt tccctcatcc atgctgtgct gtgttattta	3240
25	atntttcctg gctaagatca tgtctgaatt atgtatgaaa attattctat gtttttataa	3300
	taaaaataat atatcagaca tcgaaaaaaaa aaa	3333

30 <210> 7
 <211> 3475
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

35

40

45

50

55

60

ES 2 753 986 T3

5	aaagctctgg gccccagggg ggaggtcag cacagagagt ggaaaacagc agaggtgaca	60
	gagcagccgt gctcgaagcg ttcctggagc ccaagctctc ctccacaggt gaagacaggg	120
	ccagcaggag acaccatggg gcacctctca gccccacttc acagagtgcg tgtaccctgg	180
10	caggggcttc tgctcacagc ctcaattcta accttctgga acccgccac cactgcccag	240
	ctcaactctg aatccatgcc attcaatggt gcagagggga aggaggttct tctccttgtc	300
	cacaatctgc cccagcaact ttttggttac agctggtaca aaggggaaag agtggatggc	360
	aaccgtcaaa ttgtaggata tgcaatagga actcaacaag ctaccccagg gcccgcaaac	420
15	agcggtcgag agacaatata cccaatgca tccctgctga tccagaacgt cacccagaat	480
	gacacaggat tctacaccct acaagtcata aagtcagatc ttgtgaatga agaagcaact	540
	ggacagtacc atgtataccc ggagctgccc aagccctcca tctccagcaa caactccaac	600
20	cctgtggagg acaaggatgc tgtggccttc acctgtgaac ctgagactca ggacacaacc	660
	tacctgtggt ggataaacia tcagagcctc ccggtcagtc ccaggctgca gctgtccaat	720
	ggcaacagga cctcactct actcagtgtc acaaggaatg acacaggacc ctatgagtgt	780
25	gaaatacaga acccagtgag tgcgaaccgc agtgaccag tcaccttgaa tgtcacctat	840
	ggcccggaca cccccacat ttccccttca gacacctatt accgtccagg ggcaaacctc	900
	agcctctcct gctatgcagc ctctaacca cctgcacagt actcctggct tatcaatgga	960
30	acattccagc aaagcacaca agagctcttt atccctaaca tcaactgtgaa taatagtgga	1020
	tcctatacct gccacgcca taactcagtc actggctgca acaggaccac agtcaagacg	1080
35		
40		
45		
50		
55		
60		

ES 2 753 986 T3

	atcatagtca ctgagctaag tccagtagta gcaaagcccc aatcaaaagc cagcaagacc	1140
	acagtcacag gagataagga ctctgtgaac ctgacctgct ccacaaatga cactggaatc	1200
5	tccatccgtt ggttcttcaa aaaccagagt ctcccgtcct cggagaggat gaagctgtcc	1260
	cagggcaaca ccaccctcag cataaacctt gtcaagaggg aggatgctgg gacgtattgg	1320
	tgtgaggtct tcaacccaat cagtaagaac caaagcgacc ccatcatgct gaacgtaaac	1380
10	tataatgctc taccacaaga aaatggcctc tcacctgggg ccattgctgg cattgtgatt	1440
	ggagtagtgg ccctgggtgc tctgatagca gtagccctgg catgttttct gcatttcggg	1500
	aagaccggca gctcaggacc actccaatga cccacctaac aagatgaatg aagttactta	1560
15	ttctaccctg aactttgaag ccagcaacc cacacaacca acttcagcct ccccatccct	1620
	aacagccaca gaaataatth attcagaagt aaaaaagcag taatgaaacc tgcctgctc	1680
	actgcagtgc tgatgtatth caagtctctc accctcatca ctaggagatt cctttccctt	1740
20	gtagggtag aggggtgggg acagaaaca ctttctccta ctcttccttc ctaataggca	1800
	tctccaggct gcttgggtcac tgcccctctc tcagtgtcaa tagatgaaag tacattggga	1860
	gtctgtagga aacccaacct tcttgtcatt gaaatttggc aaagctgact ttgggaaaga	1920
25	gggaccagaa ctccccctcc ctcccccttt tcccaacctg gacttgtttt aaacttgctt	1980
	gttcagagca ctcatcctt cccaccccca gtccctgtcct atcactctaa ttgggatttg	2040
	ccatagcctt gaggttatgt ccttttccat taagtacatg tgccaggaaa caagagagag	2100
30	agaaagtaaa ggcagtaatg ccttctccta tttctccaaa gccttgtgtg aactcaccaa	2160
	acacaagaaa atcaaatata taaccaatag tgaaatgcc aacctttgtc cactgtcagg	2220
	gttgtctacc tgtaggatca gggcttaagc accttgggtc ttagctagaa taccacctaa	2280
35	tccttctggc aagcctgtct tcagagaacc cactagaagc aactaggaaa atcacttggc	2340
	aaaatccaag gcaattcctg atggaaaatg caaaagcaca tatatgtttt aatatcttta	2400
	tgggctctgt tcaaggcagt gctgagaggg aggggttata gcttcaggag ggaaccagct	2460
40	tctgataaac acaatctgct aggaacttgg gaaaggaatc agagagctgc ccttcagcga	2520
	ttatttaaat tattgttaaa gaatacacaa tttgggttat tgggattttt ctccctttct	2580
	ctgagacatt ccaccattht aatthttgta actgcttatt tatgtgaaaa gggttattht	2640
45	tacttagctt agctatgtca gccaatccga ttgccttagg tgaaagaaac caccgaaatc	2700
	cctcaggctc cttggtcagg agcctctcaa gatthtttht gtcagaggct ccaaatagaa	2760
	aataagaaaa ggtthttctt attcattgct agagctagat ttaactcagt ttctaggcac	2820
	ctcagaccaa tcatcaacta ccattctatt ccatgtttgc acctgtgcat tttctgtttg	2880
50	ccccattca ctttgtcagg aaaccttggc ctctgctaag gtgtattttg tcttgagaa	2940
	gtgggagcac cctacaggga cactatcact catgctgggtg gcattgttta cagctagaaa	3000
	gctgcactgg tgctaatgcc ccttggggaa atggggctgt gaggaggagg attataactt	3060
55	aggcctagcc tctthtaaca gcctctgaaa tttatcttht ctctatggg gtctataaat	3120
	gtatcttata ataaaaagga aggacaggag gaagacaggc aatgtactt ctcaccagct	3180
	cttctacaca gatggaatct ctttggggct aagagaaagg tthttattcta tattgcttac	3240
60	ctgatctcat gttaggccta agaggcttht tccaggagga ttagcttggg gttctctata	3300

ES 2 753 986 T3

```
ctcaggtacc tctttcaggg ttttctaacc ctgacacgga ctgtgcatac tttccctcat 3360
5  ccacgtctgtg ctgtgttatt taatttttcc tggctaagat catgtctgaa ttatgtatga 3420
aaattattct atgtttttat aataaaaata atatatcaga catcgaaaaa aaaaa 3475
```

10 <210> 8
<211> 3528
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 8

20

25

30

35

40

45

50

55

60

ES 2 753 986 T3

aaagctctgg gccccagga ggaggctcag cacagagagt ggaaaacagc agaggtgaca 60
 gagcagccgt gctcgaagcg ttcctggagc ccaagctctc ctccacaggt gaagacaggg 120
 5 ccagcaggag acaccatggg gcacctctca gcccacttc acagagtgcg tgtaccctgg 180
 caggggcttc tgctcacagc ctcacttcta accttctgga acccgccac cactgccag 240
 ctcaactactg aatccatgcc attcaatggt gcagagggga aggaggttct tctccttgtc 300
 10 cacaatctgc cccagcaact ttttggttac agctggtaca aaggggaaag agtggatggc 360
 aaccgtcaaa ttgtaggata tgcaatagga actcaacaag ctaccccagg gcccgcaaac 420
 agcggctcag agacaatata cccaatgca tccctgctga tccagaacgt caccagaat 480
 15 gacacaggat tctacacctt acaagtcata aagtcagatc ttgtgaatga agaagcaact 540
 ggacagtcc atgtataccc ggagctgccc aagcctcca tctccagcaa caactccaac 600
 cctgtggagg acaaggatgc tgtggccttc acctgtgaac ctgagactca ggacacaacc 660
 20 tacctgtggt ggataaacia tcagagcctc ccggtcagtc ccaggctgca gctgtccaat 720
 ggcaacagga ccctcactct actcagtgtc acaaggaatg acacaggacc ctatgagtgt 780
 gaaatacaga acccagtgcg tgccaaccgc agtgaccagc tcacctgaa tgtcacctat 840
 25 ggccccgaca cccccacctt tcccccttca gacacctatt accgtccagg ggcaaacctc 900
 agcctctcct gctatgcagc ctctaaccce cctgcacagt actcctggct tatcaatgga 960
 acattccagc aaagcacaca agagctcttt atccctaaca tcaactgtgaa taatagtgga 1020
 30 tcctatacct gccacgcaa taactcagtc actggctgca acaggaccac agtcaagacg 1080
 atcatagtca ctgagctaag tccagtagta gcaaagcccc aatcaaagc cagcaagacc 1140
 acagtcacag gagataagga ctctgtgaac ctgacctgct ccacaaatga cactggaatc 1200
 35 tccatccgtt ggttcttcaa aaaccagagt ctcccgctct cggagaggat gaagctgtcc 1260
 cagggcaaca ccacctcag cataaacctt gtcaagaggg aggatgctgg gacgtattgg 1320
 tgtgaggtct tcaacccaat cagtaagaac caaagcgacc ccatcatgct gaacgtaaac 1380
 40 tataatgctc taccacaaga aaatggcctc tcacctgggg ccattgctgg cattgtgatt 1440
 ggagtagtgg ccctggttgc tctgatagca gtagccctgg catgttttct gcatttcggg 1500
 aagaccggca gggcaagcga ccagcgtgat ctcacagagc acaaaccctc agtctccaac 1560
 45 cacactcagg accactcaa tgaccacctt aacaagatga atgaagtac ttattctacc 1620
 ctgaactttg aagccagca acccacacia ccaacttcag cctccccatc cctaacagcc 1680
 acagaaataa tttattcaga agtaaaaaag cagtaatgaa acctgtcctg ctcaactgcag 1740
 50 tgctgatgta tttcaagtct ctcaacctca tcaactaggag attcctttcc cctgtagggg 1800
 tagaggggtg gggacagaaa caactttctc ctactcttcc ttcctaatag gcatctccag 1860

 55

 60

ES 2 753 986 T3

5 gctgcctggt cactgcccct ctctcagtgt caatagatga aagtacattg ggagtctgta 1920
 ggaaacccaa ccttcttgtc attgaaatth ggcaaagctg actttgggaa agagggacca 1980
 gaacttcccc tcccttcccc ttttcccaac ctggacttgt tttaaacttg cctgttcaga 2040
 gcactcattc cttcccaccc ccagtcctgt cctatcactc taattcggat ttgccatagc 2100
 10 cttgagggta tgtccttttc cattaagtac atgtgccagg aaacaagaga gagagaaagt 2160
 aaaggcagta atgccttctc ctatttctcc aaagccttgt gtgaactcac caaacacaag 2220
 aaaatcaaat atataaccaa tagtgaaatg ccacaccttt gtccactgtc aggggtgtc 2280
 acctgtagga tcagggctca agcacccttg tgccttagcta gaataaccacc taatccttct 2340
 15 ggcaagcctg tcttcagaga acccactaga agcaactagg aaaatcactt gccaaaaatcc 2400
 aaggcaattc ctgatggaaa atgcaaaagc acatatatgt tttaatatct ttatgggctc 2460
 tgttcaaggc agtgctgaga gggagggggt atagcttcag gagggaacca gcttctgata 2520
 20 aacacaatct gctaggaact tgggaaagga atcagagagc tgcccttcag cgattattta 2580
 aattattggt aaagaataca caatttgggg tattgggatt tttctccttt tctctgagac 2640
 attccacat ttaattttt gtaactgctt atttatgtga aaagggttat ttttacttag 2700
 25 cttagctatg tcagccaatc cgattgcctt aggtgaaaga aaccaccgaa atccctcagg 2760
 tcccttggtc aggagcctct caagatthtt tttgtcagag gctccaaata gaaaataaga 2820
 aaaggthttc ttcattcatg gctagagcta gatttaactc agthttctagg cacctcagac 2880
 30 caatcatcaa ctaccattct attccatgth tgcacctgtg catthttctgt ttgccccat 2940
 tcactthgtc aggaaacctt ggcctctgct aaggthgatt tggctcttga gaagthggag 3000
 caccctacag ggacactatc actcatgctg gtggcattgt ttacagctag aaagctgcac 3060
 35 tggthgtaat gccctthggg gaaatggggc tgtgaggagg aggattataa cttaggccta 3120
 gcctctthta acagcctctg aaatthtatct tttctctat ggggtctata aatgthtatct 3180
 ataataaaaa ggaaggacag gaggaagaca ggcaaatgta cttctcacc agthctctac 3240
 40 acagatggaa tctctthggg gctaagagaa agththttatt ctatthtgc taccctgatct 3300
 catgthtagc ctaagaggct thctccagga ggathagctt ggagthtctct atactcaggt 3360
 acctctthca gggththtca acctgacac ggactgtgca tactthccct catccatgct 3420
 45 gtgctgtgth atttaattht tcttggtctaa gatcatgct gaathatgta tgaaaattat 3480
 tctatgthtt tataataaaa ataatatatc agacatcgaa aaaaaaaa 3528

50 <210> 9
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 9

60

ES 2 753 986 T3

5 Gly Arg Gly Asp Arg Ala Ala Val Leu Glu Ala Phe Leu Glu Pro Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Gly Glu Asp Arg Ala Ser Arg Arg His His Gly Ala
20 25 30

10 Pro Leu Ser Pro Thr Ser Gln Ser Ala Cys Thr Leu Ala Gly Leu Leu

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

ES 2 753 986 T3

Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu Leu Ser Pro
 340 345 350
 5 Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr Gly
 355 360 365
 10 Asp Lys Asp Ser Val Asp Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly Ile
 370 375 380
 Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu Arg
 385 390 395 400
 15 Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val Lys
 405 410 415
 20 Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile Ser
 420 425 430
 Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala Leu
 435 440 445
 25 Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly Ile Val Ile
 450 455 460
 30 Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu Ala Cys Phe
 465 470 475 480
 Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Ser Ser Gly Pro Leu Gln
 485 490
 35 <210> 10
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 10
 45
 50
 55
 60

ES 2 753 986 T3

1 Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
 5 Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 10 Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 15 Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 20 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 25 Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
 30 Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 35
 40
 45
 50
 55
 60

ES 2 753 986 T3

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125

5

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140

10

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175

15

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190

20

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205

Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220

25

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240

30

Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255

Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270

35

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285

40

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300

Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
 305 310 315 320

45

Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
 325 330 335

Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
 340 345 350

50

Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
 355 360 365

55

Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
 370 375 380

Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
 385 390 395 400

ES 2 753 986 T3

Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
 405 410 415
 5 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 420 425 430
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 435 440 445
 10 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Thr Thr Pro Met Thr
 450 455 460
 15 His Leu Thr Arg
 465
 <210> 11
 <211> 368
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 25 Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
 1 5 10 15
 Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 20 25 30
 30 Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 35 40 45
 35 Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 50 55 60
 40 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
 85 90 95
 45 Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110
 50 Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140
 55 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 60 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190

ES 2 753 986 T3

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 5 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220
 10 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 15 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 20 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300
 25 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Asp
 305 310 315 320
 30 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 325 330 335
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 340 345 350
 35 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Ser Ser Gly Pro Leu Gln
 355 360 365

40 <210> 12
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 12

50

55

60

ES 2 753 986 T3

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

ES 2 753 986 T3

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110
 5 Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140
 10 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 15 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 20 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 25 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 30 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 35 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 40 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300
 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Asp
 305 310 315 320
 45 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 325 330 335
 50 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 340 345 350
 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
 355 360 365
 55 Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
 370 375 380
 60

ES 2 753 986 T3

Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
 385 390 395 400

5 Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
 405 410 415

Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
 420 425 430

10 <210> 13
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 13

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
 1 5 10 15

20 Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 35 40 45

25 Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 50 55 60

30 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 65 70 75 80

Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
 85 90 95

35 Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110

40 Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140

45 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160

50 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190

55 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205

60 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220

ES 2 753 986 T3

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 5 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 10 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 15 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300
 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
 305 310 315 320
 20 Arg Gln Asn Leu Thr Met Leu Pro Arg Leu Asp Ser Asn Ser Trp Ala
 325 330 335
 25 Gln Ala Ile Leu Pro Ser Val Ser Gln Ser Ala Glu Ile Thr Asp Asn
 340 345 350
 Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly Ile
 355 360 365
 30 Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu Ala
 370 375 380
 35 Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg Asp
 385 390 395 400
 Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His Ser
 405 410 415
 40 Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu Asn
 420 425 430
 45 Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser Leu
 435 440 445
 Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
 450 455 460
 <210> 14
 50 <211> 526
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 55 Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
 1 5 10 15
 Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 20 25 30
 60

ES 2 753 986 T3

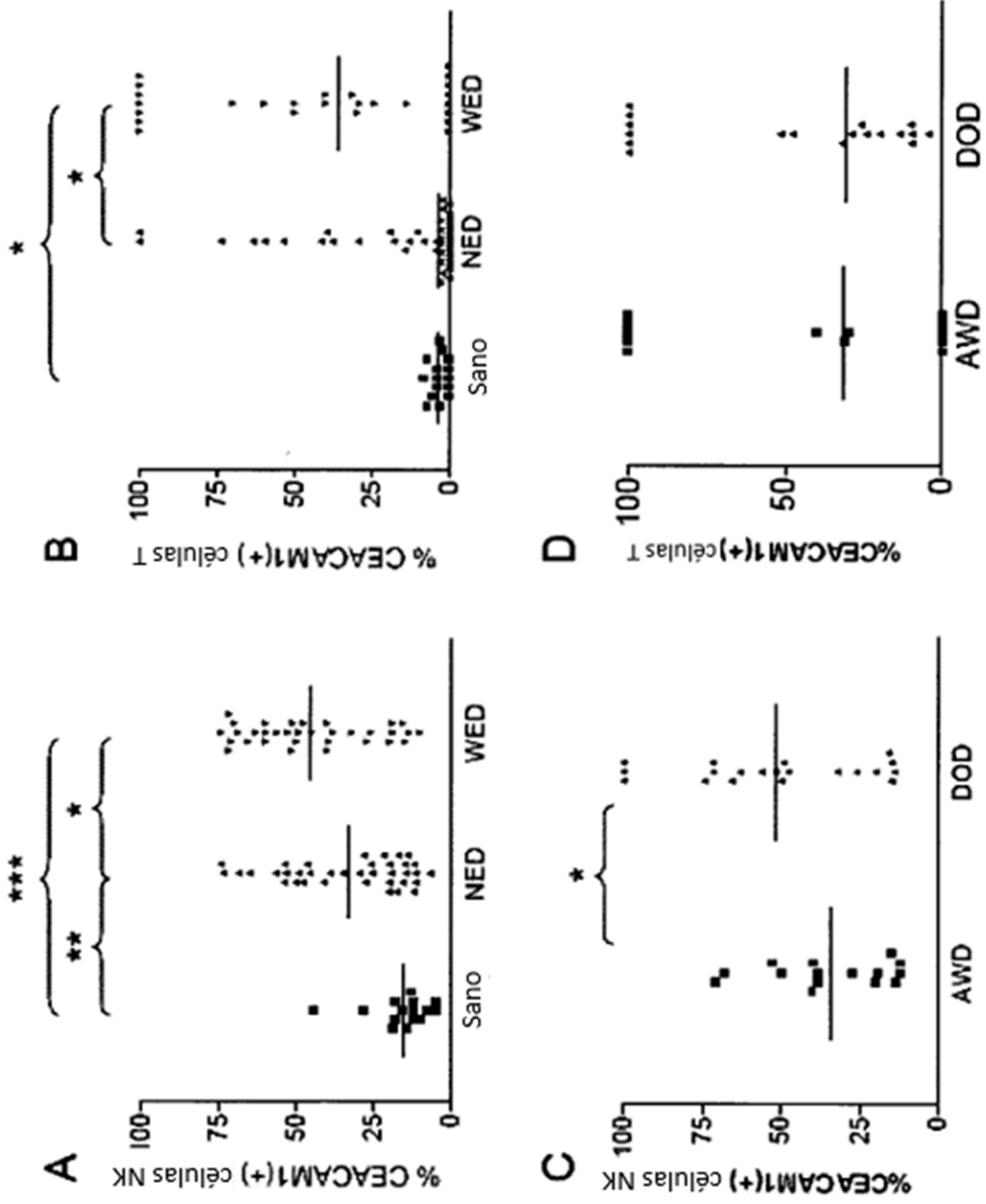
Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 35 40 45
 5 Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 50 55 60
 10 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
 85 90 95
 15 Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110
 20 Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140
 25 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 30 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 35 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 40 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220
 45 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 50 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 55 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300
 60 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
 305 310 315 320
 65

ES 2 753 986 T3

5 Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
 325 330 335
 Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
 340 345 350
 10 Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
 355 360 365
 Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
 370 375 380
 15 Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
 385 390 395 400
 20 Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
 405 410 415
 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 420 425 430
 25 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 435 440 445
 30 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
 450 455 460
 Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
 465 470 475 480
 35 Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
 485 490 495
 40 Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
 500 505 510
 45 Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
 515 520 525
 50
 55
 60
 65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para diagnosticar melanoma, comprendiendo el método la determinación de un nivel de CEACAM1 en linfocitos de sangre periféricos aislados (PBL) de un sujeto que los necesita, en el que una regulación al alza de dicho nivel de CEACAM1 por encima de un umbral predeterminado es indicativo de melanoma en dicho sujeto, en el que dichos PBL comprenden células T o células NK.
- 10 **2.** El método de la reivindicación 1, en el que dichos PBL comprenden células T.
- 10 **3.** El método de la reivindicación 1, en el que dichos PBL comprenden células NK.
- 15 **4.** El método de la reivindicación 1, en el que dicha determinación de un nivel de CEACAM1 en linfocitos de sangre periféricos aislados (PBLs) es efectuado por FACS.
- 15 **5.** El método de la reivindicación 1, que comprende además informar al sujeto sobre la presencia o ausencia del melanoma o etapa del mismo.
- 20 **6.** El método de la reivindicación 1, que comprende además validar el diagnóstico o pronóstico utilizando un método seleccionado del grupo compuesto por biopsia quirúrgica, imagenología, patología y pruebas a nivel molecular.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



FIGS. 1A-D

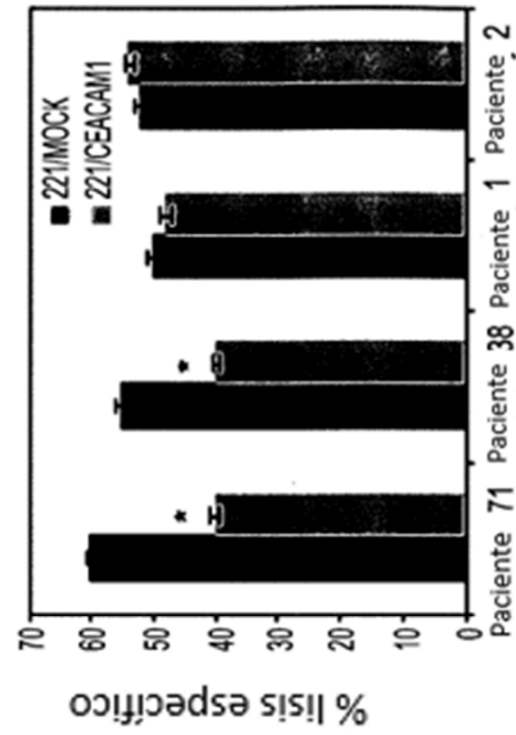


FIG. 2B

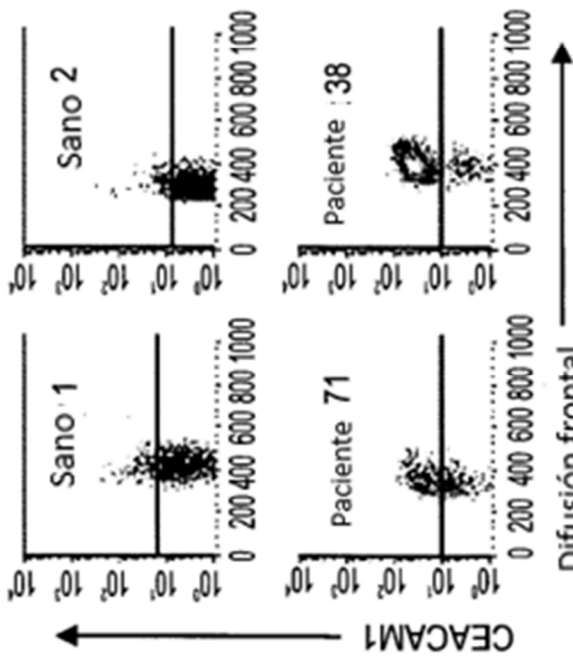


FIG. 2A

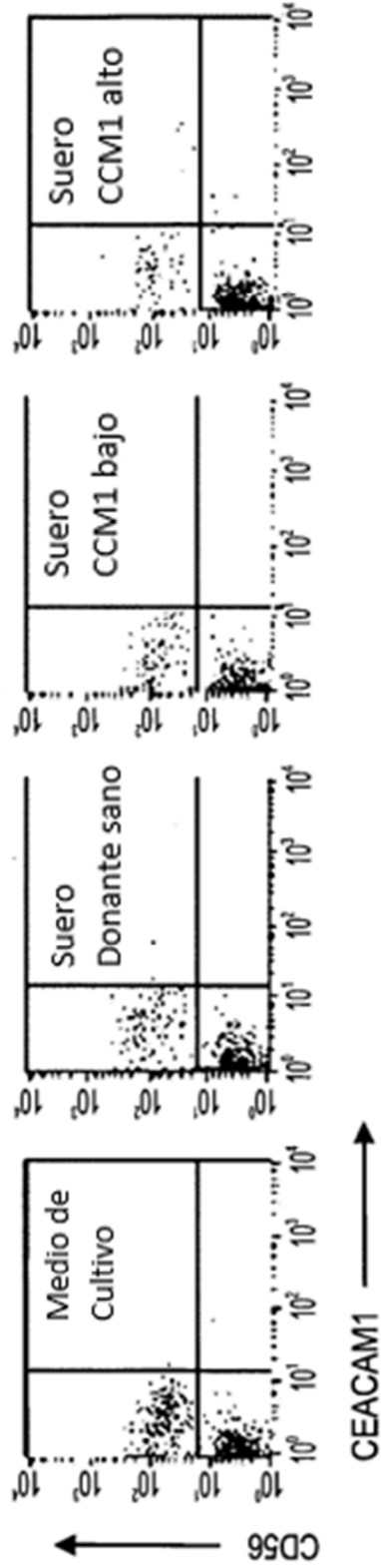


FIG. 2C

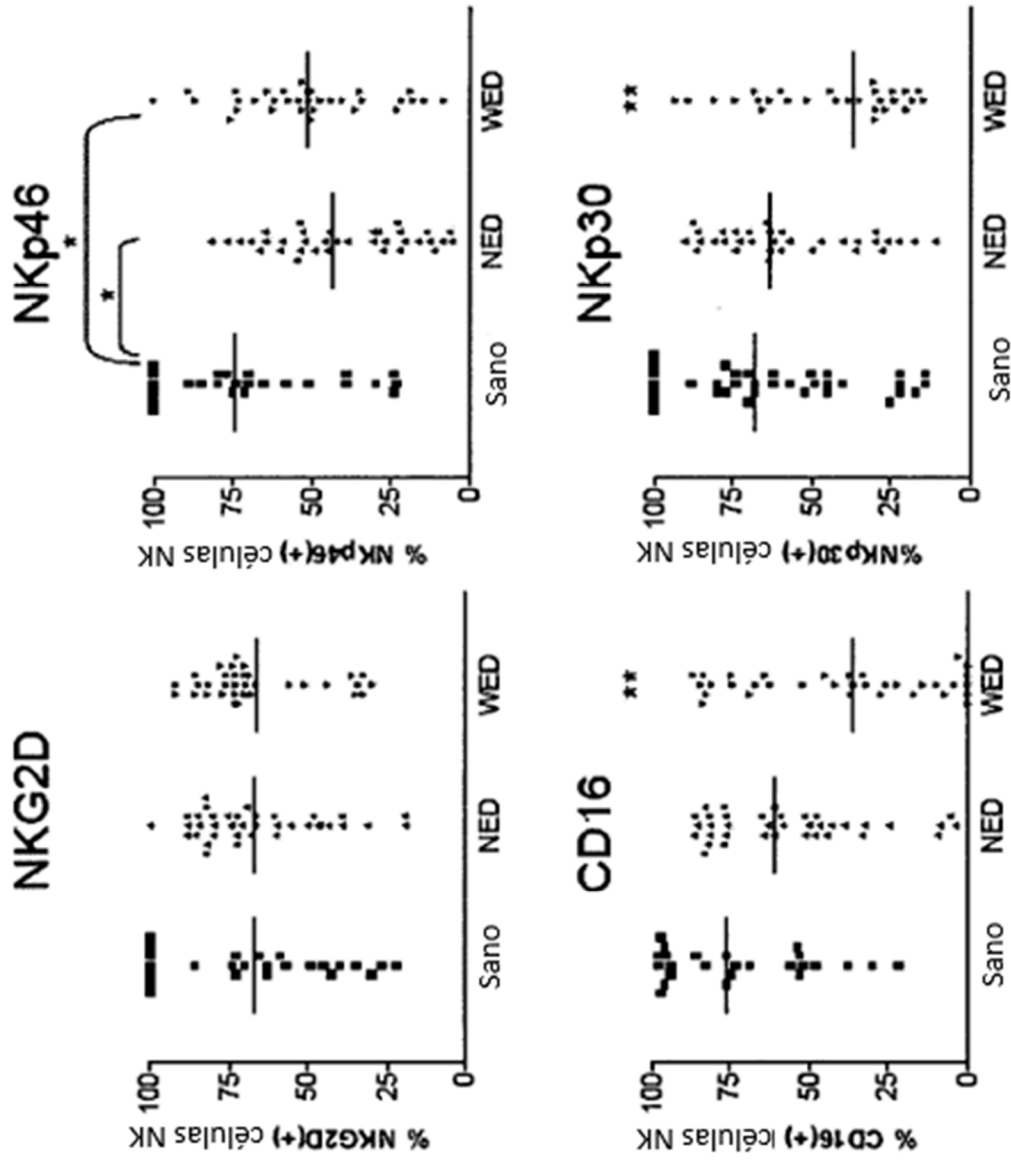


FIG. 3