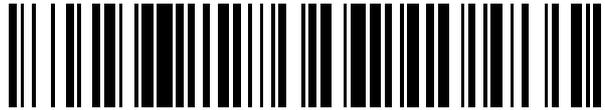


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 423**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00	(2006.01)
C12P 21/08	(2006.01)
C12N 5/07	(2010.01)
C12N 5/16	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2014 PCT/US2014/059162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15051320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2014 E 14850426 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3052522**

54 Título: **Sistemas y procedimientos de anticuerpos anti-SOX10**

30 Prioridad:

03.10.2013 US 201361886488 P
19.02.2014 US 201461941907 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2020

73 Titular/es:

BIOCARE MEDICAL, LLC (100.0%)
4040 PIKE LANE
CONCORD, CA 94520, US

72 Inventor/es:

TACHA, DAVID y
QI, WEIMIN

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 765 423 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

Sistemas y procedimientos de anticuerpos anti-SOX10

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos anti-SOX10, composiciones, cócteles y kits que comprenden los anticuerpos y procedimientos para utilizar los anticuerpos.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

El examen microscópico de muestras de tejido, de manera particular las obtenidas por biopsia, es un procedimiento común para el diagnóstico de enfermedades. En particular, la inmunohistoquímica (IHC), una técnica en la que se utilizan anticuerpos específicos para detectar la expresión de proteínas específicas en la muestra de tejido, puede ser una herramienta valiosa para el diagnóstico, de manera particular para la detección y el diagnóstico del cáncer.

El gen 10 HMG-Box relacionado con Sry, ubicado posiblemente en el cromosoma 22q13, puede codificar una proteína conocida como SOX10, que es posiblemente un factor de transcripción en seres humanos que puede ser importante para la cresta neural, el sistema nervioso periférico y el desarrollo de células melanocíticas. La SOX10 puede ser esencial para la formación de nervios en el intestino grueso y los melanocitos. Los melanocitos son posiblemente células que producen pigmento, que se encuentran en la piel, los ojos y el cabello. La proteína SOX10 se puede expresar ampliamente en tejidos humanos normales, entre los que se incluyen melanocitos, tejido mamario, ganglios craneales, ganglios de la raíz dorsal y la vesícula óptica. La SOX10 también puede ser un marcador importante en tumores malignos, tales como el melanoma, el carcinoma de mama, los gliomas y similares, así como los tumores benignos como los schwannomas y similares. El factor transcripcional SOX10 puede ser uno de los determinantes clave de la diferenciación oligodendroglial. La mayoría de los oligodendrogliomas, pero también una gran fracción de los astrocitomas, incluidos los glioblastomas menos diferenciados, posiblemente expresen SOX10.

El melanoma desmoplásico puede ser una variante rara del melanoma cutáneo invasivo, con una tasa de incidencia anual de, aproximadamente, 2 por 1.000.000. Las características únicas de este tipo de melanoma pueden incluir invasión profunda, aumento de la invasión perineural, recurrencia local y posiblemente un diagnóstico tardío. Los estudios pueden haber demostrado que la SOX10 es un marcador altamente sensible y específico de melanoma tanto en lesiones primarias como metastásicas. Sobre la base de la expresión en melanocitos de piel no neoplásica y benigna, y en nevos benignos y displásicos, la SOX10 puede no ser un marcador útil para diferenciar entre lesiones cutáneas pigmentadas benignas y malignas.

El melanoma desmoplásico (DM, de *desmoplastic melanoma*) puede presentar problemas de diagnóstico, posiblemente debido a la similitud de los imitadores histológicos e incluso a una tinción inmunohistoquímica limitada. En un estudio, la SOX10 puede haber mostrado una sensibilidad del 100 % para DM y posiblemente SOX10 fue negativa en todas las imitaciones histológicas de la dermis/subcutis, incluidos el carcinoma de células fusiformes, AFX y sarcomas. Aunque los anticuerpos anti-S100 pueden teñir típicamente el DM, otros marcadores de melanoma (por ejemplo, HMB-45 y Melan-A) son, posiblemente, de manera frecuente negativos.

Tradicionalmente, los marcadores de melanoma, tales como S100, HMB45, MART-1 (posiblemente, conocido también como Melan-A) y tirosinasa se pueden haber utilizado en un panel de anticuerpos para identificar el melanoma. El anticuerpo anti-S100 se puede haber utilizado como un analizador de melanoma y, posiblemente, haya sido un marcador más sensible en comparación con otros marcadores de melanoma; sin embargo, el S100 puede tener una desventaja de una especificidad subóptima, ya que puede teñir tanto los ganglios linfáticos como el cerebro, que son sitios comunes de melanoma metastásico y sus imitaciones. HMB45, MART-1 y tirosinasa pueden ser posiblemente más específicos que la proteína S100; sin embargo, este panel de anticuerpos puede ser negativo en melanoma desmoplásico y melanoma de células fusiformes y, por lo tanto, posiblemente, carezca de sensibilidad.

Es posible que se haya demostrado que un cóctel de anticuerpos de MART-1 y tirosinasa sea un marcador muy sensible de melanomas metastásicos y, posiblemente, incluso comparable a la proteína S100 (aproximadamente, el 98 % frente a, aproximadamente, el 100 %, respectivamente). Sin embargo, S100 puede haber sido aún más sensible al melanoma desmoplásico y al melanoma de células fusiformes. El beneficio potencial de combinar SOX10, con su sensibilidad para el melanoma, que incluye el melanoma desmoplásico y el melanoma de células fusiformes, y uno o más marcadores de melanoma, posiblemente incluso aquellos que no son sensibles al melanoma desmoplásico o melanoma de células fusiformes, incluidos posiblemente MART-1 y tirosinasa, puede no ser conocido. Esta combinación puede proporcionar un marcador superior para el melanoma.

La SOX10 puede ser también un factor de transcripción de la cresta neural crucial para la especificación, maduración y mantenimiento de melanocitos y células de Schwann. La SOX10 también puede expresarse difusamente en schwannomas y neurofibromas. A pesar de una falta de especificidad bien caracterizada, los patólogos pueden utilizar habitualmente S100 en el diagnóstico de tumores derivados de la cresta neural. Estudios

recientes han demostrado que, posiblemente, SOX10 es un marcador confiable de diferenciación de la cresta neural que puede expresarse consistentemente en tumores schwannianos y melanocíticos, posiblemente ofreciendo ventajas sobre S100.

5 La expresión de SOX10 se puede observar en células de mama mioepiteliales en glándulas mamarias normales. La SOX10 se puede haber mostrado en los tipos de cáncer de mama con carcinoma metaplásico basal, no clasificado, triple negativo; y posiblemente apoya el concepto de que estas neoplasias pueden mostrar diferenciación mioepitelial. En los cánceres de pulmón, se pueden encontrar células sustentaculares en, aproximadamente, la
10 mitad de los tumores carcinoides pulmonares. Se utilizó un anticuerpo para SOX10 para, posiblemente, investigar 113 casos pulmonares que se clasificaron de otra manera (NEC). Las células sustentaculares pueden haberse observado, posiblemente, en el 66,7 % de los casos de carcinoides típicos (TC) e incluso posiblemente en el 58,3 % de los casos de carcinoides atípicos (AC), pero pueden no haberse observado en los NEC de alto grado.

15 La SOX10 puede mostrar una mayor especificidad para tumores de origen de cresta neural, posiblemente cuando se compara con S100. En un estudio, SOX10 pudo haber sido positiva posiblemente en solo 5 de 668 casos (el 99 % de especificidad) en tumores no schwannianos, no melanocíticos, mientras que S100 pudo haber sido positiva posiblemente en 53 de 668 casos (91 % de especificidad). Por lo tanto, la SOX10 puede ser útil en lugar de S100, o posiblemente, en combinación con la misma, para el diagnóstico de tumores de tejidos blandos.

20 Hasta la fecha, la mayoría de los estudios publicados pueden haber utilizado un SOX10 policlonal de cabra para procedimientos inmunohistoquímicos (IHC). El artículo de Kreutzer et al. "A robust method to derive functional neural crests cells from human pluripotent stem cells" da a conocer la utilización de un anticuerpo policlonal anti-SOX10 de conejo (abcam ab108408) para inmunocitoquímica. El artículo de Kang et al. "Diagnostic utility of SOX10 to distinguish malignant peripheral nerve sheath tumor from synovial sarcoma, including intraneural synovial sarcoma"
25 da a conocer la utilización de un anticuerpo policlonal anti-SOX10 de cabra (sc-17342, Santa Cruz, Biotechnology) para la inmunohistoquímica de tumores de las vainas neurales. El sc-17342 se había utilizado para detectar melanoma (Palla et al. Am J Dermatopathol, vol. 35, nº 5, 2013 páginas 576-581). Los anticuerpos policlonales de cabra pueden no ser generalmente preferentes para su utilización en procedimientos de IHC, dado que los anticuerpos monoclonales pueden ser preferentes, posiblemente incluso los anticuerpos de ratón o conejo pueden ser preferentes. De manera particular para los procedimientos IHC utilizados en el diagnóstico clínico, pueden ser preferentes los anticuerpos monoclonales, posiblemente incluso sean preferentes los anticuerpos de ratón o conejo. Puede existir una clara necesidad de que un marcador diferencie las células fusiformes y el melanoma desmoplásico de otros tumores y sus imitadores y, posiblemente, los esfuerzos extensos realizados hasta la fecha pueden no haber producido dicho marcador. Posiblemente, un anticuerpo monoclonal SOX10 sería muy valioso en el entorno
35 clínico para el diagnóstico.

Por lo tanto, existe una clara necesidad de un anticuerpo anti-SOX10 sensible e incluso específico para su utilización en el diagnóstico del cáncer. Las realizaciones de la presente invención dan a conocer un anticuerpo monoclonal de ratón anti-SOX10 [clon BC34] que puede ser altamente sensible e incluso puede ser altamente específico. Un
40 ejemplo de la presente invención da a conocer un anticuerpo monoclonal anti-SOX10 de ratón que puede detectar la presencia o ausencia de proteína SOX10 en ciertos tipos de cáncer, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, melanoma, melanoma de células fusiformes, melanoma desmoplásico, nevos, schwannomas, cáncer de mama, rabdomiosarcoma, leiomiomasarcoma o similares. Un ejemplo de la presente invención puede haber demostrado una excelente sensibilidad frente al melanoma (aproximadamente 105/109, aproximadamente, el 9 %)
45 posiblemente, con incluso una especificidad excelente frente a otros tejidos normales, benignos y malignos. En comparación con el anticuerpo anti-SOX10 policlonal (RP) de conejo conocido, el BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón puede haber demostrado una mayor sensibilidad y posiblemente una mayor especificidad, con patrones de tinción más limpios, posiblemente con menos artefactos y posiblemente sin teñir muchos carcinoides, a la vez que ofrece las ventajas de un anticuerpo monoclonal. El BC34 también puede no teñir algunas muestras, que pueden haber sido teñidas por el anticuerpo anti-SOX10 RP, lo que posiblemente indica la especificidad superior de BC34 respecto a las alternativas. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal anti-SOX10, tal como el BC34, puede ser preferente para el diagnóstico, en comparación con los anticuerpos alternativos, incluidos los anticuerpos anti-SOX10 alternativos.

55 El desarrollo de un anticuerpo anti-SOX10 puede ayudar en el diagnóstico de cánceres primarios e incluso metastásicos, de manera particular melanoma, melanoma de células fusiformes, melanoma desmoplásico, nevos, schwannomas, cáncer de mama, rabdomiosarcoma, leiomiomasarcoma o similares. Se han dado a conocer en la presente invención anticuerpos anti-SOX10, tales como el anticuerpo [BC34] anti-SOX10 monoclonal de ratón, con una sensibilidad de tinción posiblemente igual o superior y, posiblemente, una especificidad de tinción incluso superior en comparación con anticuerpos anti-SOX10 alternativos, incluido el anticuerpo anti-SOX10 RP.
60

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

65 La presente invención se refiere a una preparación aislada de un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente a una proteína SOX10, según la reivindicación 1. Se dan a conocer, además, procedimientos para producir dicho anticuerpo, composiciones que comprenden dicho anticuerpo y procedimientos para detectar una

proteína en una muestra biológica utilizando dicho anticuerpo. Detalles adicionales se dan a conocer en las reivindicaciones dependientes.

5 En realizaciones, los clones de anticuerpos anti-SOX10, tales como el clon BC34 de anticuerpo anti-SOX10, se pueden obtener inmunizando ratones Balb/C con una o más proteínas correspondientes a un subconjunto de aminoácidos 147-253 de la proteína SOX10 humana. La proteína SOX10 puede inyectarse en los ratones BALB/c, con un adyuvante, a través de inyecciones intraperitoneales, posiblemente 5 veces, aproximadamente, a intervalos de, aproximadamente, tres semanas. La reactividad inmunitaria a SOX10 puede evaluarse mediante ELISA directo sobre proteína SOX10 recombinante. Se pueden elegir ratones con el título más elevado para desarrollar hibridomas mediante fusión celular. Se puede elegir un clon de hibridoma que demuestre la mejor reactividad frente a SOX10 en tejidos humanos y se puede designar como BC34. Se puede analizar el isotipo del clon BC34 y puede identificarse como IgG1 de ratón. El anticuerpo BC34 se puede producir mediante cultivo tisular a gran escala de las células de hibridoma y por ascitis en ratones BALB/c. El sobrenadante y la ascitis del anticuerpo se pueden recoger y el anticuerpo se puede purificar mediante una columna de afinidad de proteína A. El BC34 puede demostrar reactividad específica a la proteína SOX10 humana mediante ELISA, transferencia Western e incluso en tejidos humanos.

Los anticuerpos anti-SOX10, tales como el anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón, pueden ser útiles para la detección de SOX10 en muestras de tejido, posiblemente con diversas ventajas significativas, pero inesperadas, respecto a los anticuerpos para SOX10 conocidos actualmente. Las muestras biológicas se pueden analizar y pueden incluir, sin que constituyan limitación, tejido de la piel, tejido pulmonar, tejido de la vejiga, tejido mamario, tejido de la próstata, tejido normal, tejido neoplásico, tejido de la vejiga, tejido de riñón, tejido ovárico, tejido tiroideo, tejido endometrial, tejido renal, tejido amigdalal, tejido pancreático, tejido de colon, tejido de ganglios linfáticos, tejido pancreático neoplásico, tejido estomacal, tejido prostático, tejido pulmonar, tejido mamario y similares. Cuando se utilizan en los procedimientos de inmunohistoquímica tradicionales, los anticuerpos anti-SOX10, tales como el anticuerpo BC34 anti-SOX10 de ratón pueden dar como resultado una tinción nuclear de SOX10 con una sensibilidad similar o posiblemente superior a la de los anticuerpos anti-SOX10 conocidos, lo que puede ofrecer mejoras significativas. Además, los anticuerpos anti-SOX10, tales como el BC34, pueden mostrar una mayor especificidad, posiblemente en comparación con otros anticuerpos anti-SOX10 conocidos, lo que puede ofrecer mejoras significativas. Además de las posibles ventajas de derivar de una fuente monoclonal, los anticuerpos anti-SOX10, tales como el BC34, pueden ofrecer también una tinción más limpia, con menos artefactos y una mayor especificidad del tipo de célula, por ejemplo, posiblemente no tiñen los carcinoides, en comparación con otros anticuerpos anti-SOX10 conocidos. Con los anticuerpos anti-SOX10, tales como el BC34, el análisis de la muestra puede simplificarse y la expresión de SOX10 en las células tumorales puede ser fácilmente identificable, permitiendo el diagnóstico en casos que, de otro modo, serían difíciles, ambiguos o incluso imposibles de diagnosticar.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma de la pared torácica (aumento de 10X).

La figura 2 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma del cuero cabelludo (aumento de 20X).

La figura 3 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma del hombro (aumento de 10X). Se puede observar una tinción reducida, o posiblemente, la ausencia de tinción en esta muestra.

La figura 4 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma metastásico en un ganglio linfático (aumento de 20X).

La figura 5 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (rojo) que tiñe un caso de melanoma de células en globo (aumento de 10X).

La figura 6 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (rojo) que tiñe un caso de melanoma epitelioide (aumento de 10X).

La figura 7 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de tumor de nervio periférico (aumento de 20X).

La figura 8 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (rojo) que tiñe un caso de melanoma perivascular (aumento de 10X).

La figura 9 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (rojo) que tiñe un caso de melanoma perivascular (aumento de 20X).

La figura 10 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (rojo) que tiñe un caso de melanoma rabdoide (aumento de 10X).

La figura 11 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (rojo) que tiñe un caso de melanoma sarcomatoide (aumento de 10X).

La figura 12 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (rojo) que tiñe un caso de melanoma plasmacitoide (aumento de 10X).

La figura 13 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de nevo compuesto de piel (aumento de 20X).

La figura 14 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de nevo intradérmico de la mejilla (aumento de 20X).

- La figura 15 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de nevo de unión de la piel (aumento de 20X).
- La figura 16 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de schwannoma (aumento de 10X).
- 5 La figura 17 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe células de argentafina en el colon normal (aumento de 20X).
- La figura 18 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe neuronas cerebrales normales (aumento de 20X).
- La figura 19 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe células mioepiteliales en glándulas mamarias normales (aumento de 20X).
- 10 La figura 20 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe la piel normal (aumento de 20X).
- La figura 21 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe la glándula salival normal (aumento de 20X).
- 15 La figura 22 muestra una versión en color de un ejemplo del anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe tejido de mama, posiblemente cáncer de mama.
- La figura 23 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 (marrón) que tiñe la misma muestra de mama de la figura 22. La tinción puede ser menos intensa que la observada con BC34 en la figura 22.
- La figura 24 muestra una versión en color de un ejemplo del anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe tejido pulmonar, posiblemente adenocarcinoma de pulmón. La tinción puede ser reducida, o posiblemente estar ausente, de manera particular en comparación con la figura 25.
- 20 La figura 25 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 (marrón) que tiñe la misma muestra de pulmón de la figura 24. La tinción citoplasmática se puede observar en esta muestra, en contraste con la tinción nuclear esperada para SOX10.
- 25 La figura 26 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe melanoma. La tinción puede ser posiblemente más intensa que la observada en la figura 27.
- La figura 27 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 (marrón) que tiñe la misma muestra de melanoma de la figura 26. La tinción puede ser menos intensa que la observada con BC34 en la figura 26.
- 30 La figura 28 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe melanoma. La tinción puede ser posiblemente más intensa que la observada en la figura 29.
- La figura 29 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 (marrón) que tiñe la misma muestra de mama de la figura 28. La tinción puede ser reducida, o posiblemente estar ausente, en comparación con la observada con BC34 en la figura 28.
- 35 La figura 30 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe melanoma. La tinción puede ser posiblemente más intensa que la observada en la figura 31.
- La figura 31 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 (marrón) que tiñe la misma muestra de mama de la figura 30. La tinción puede ser reducida, o posiblemente estar ausente, en comparación con la observada con BC34 en la figura 30.
- 40 La figura 32 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe vejiga normal. La tinción puede ser reducida, o posiblemente estar ausente, de manera particular en comparación con la figura 33.
- La figura 33 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 (marrón) que tiñe la misma muestra de vejiga de la figura 32. La tinción citoplasmática se puede observar en esta muestra, en contraste con la tinción nuclear esperada para SOX10.
- 45 La figura 34 muestra una versión en color de un ejemplo del anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe carcinoides intestinales (aumento de 20X).
- La figura 35 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de rhabdomyosarcoma de alveolo (aumento de 20X).
- 50 La figura 36 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de astrocitoma (aumento de 10X).
- La figura 37 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de cáncer de mama (aumento de 20X).
- La figura 38 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de leiomioma de grado II intermedio (aumento de 10X).
- 55 La figura 39 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma desmoplásico (aumento de 10X).
- La figura 40 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma desmoplásico (aumento de 20X).
- 60 La figura 41 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de schwannoma benigno (aumento de 10X).
- La figura 42 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma de células fusiformes (aumento de 20X).
- 65 La figura 43 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma de células fusiformes (aumento de 10X).

- La figura 44 muestra una versión en color de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 (marrón) que tiñe un caso de melanoma de células fusiformes (aumento de 20X).
- La figura 45 muestra una versión en color de un ejemplo de un cóctel de anticuerpos de tirosinasa + MART-1 (rojo) que tiñe un caso de melanoma.
- 5 La figura 46 muestra una versión en color de un ejemplo de [BC34] SOX10 (rojo) que tiñe el mismo caso de melanoma que se muestra en la figura 45.
- La figura 47 muestra una versión en color de un primer ejemplo de un cóctel de anticuerpos de SOX10 + tirosinasa + MART-1 (rojo) que tiñe casos de melanoma.
- 10 La figura 48 muestra una versión en color de un segundo ejemplo de un cóctel de anticuerpos de SOX10 + tirosinasa + MART-1 (rojo) que tiñe casos de melanoma.
- La figura 49 muestra una versión en color de un ejemplo de BC34 (rojo) que tiñe un caso de melanoma.
- La figura 50 muestra una versión en color del mismo caso de melanoma que se muestra en la figura 49 teñido con un cóctel de tirosinasa + MART-1 (rojo). Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción, aunque se pueden observar melanocitos pigmentados.
- 15 La figura 51 muestra una versión en color de un ejemplo de un cóctel de tirosinasa + MART-1 (rojo) que tiñe un caso de melanoma.
- La figura 52 muestra una versión en color del mismo caso de melanoma que se muestra en la figura 51 teñido con BC34 (rojo). Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.
- 20 La figura 53 muestra una versión en color de un ejemplo de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 (rojo) que tiñe un caso de melanoma.
- La figura 54 muestra una versión en color del mismo caso de melanoma que se muestra en la figura 49 teñido con S100 (rojo). Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.
- La figura 55 muestra una versión en color de un ejemplo de ganglio linfático teñido con un cóctel de anticuerpos de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 (rojo). Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.
- 25 La figura 56 muestra una versión en color de un ejemplo de cerebro teñido con un cóctel de anticuerpos de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 (rojo). Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.
- La figura 57 muestra una versión en color de un ejemplo de médula ósea teñida con un cóctel de anticuerpos de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 (rojo). Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.
- 30 La figura 58 muestra una versión en color de un ejemplo de tinción con S100 (rojo) en el mismo caso de ganglios linfáticos que se muestra en la figura 55.
- La figura 59 muestra una versión en color de un ejemplo de tinción con S100 (rojo) en el mismo caso de cerebro que se muestra en la figura 56.
- 35 La figura 60 muestra una versión en color de un ejemplo de tinción con S100 (rojo) en el mismo caso de médula ósea que se muestra en la figura 57.
- La figura 61 muestra un ejemplo de un resumen esquemático de un kit, según diversas realizaciones de la presente invención.
- 40 La figura 62 muestra un ejemplo de un resumen esquemático de un procedimiento de inmunoensayo, según diversas realizaciones de la presente invención.
- La figura 63 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma de la pared torácica (aumento de 10X).
- 45 La figura 64 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma del cuero cabelludo (aumento de 20X).
- La figura 65 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma del hombro (aumento de 10X). Se puede observar una tinción reducida, o posiblemente, la ausencia de tinción en esta muestra.
- 50 La figura 66 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma metastásico en un ganglio linfático (aumento de 20X).
- La figura 67 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma de células en globo (aumento de 10X).
- La figura 68 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma epitelioide (aumento de 10X).
- 55 La figura 69 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de tumor de nervio periférico (aumento de 20X).
- La figura 70 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma perivasculoso (aumento de 10X).
- La figura 71 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma perivasculoso (aumento de 20X).
- 60 La figura 72 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma rabdoide (aumento de 10X).
- La figura 73 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma sarcomatoide (aumento de 10X).
- 65 La figura 74 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma plasmacitoide (aumento de 10X).

- La figura 75 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de nevo compuesto de la piel (aumento de 20X).
- La figura 76 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de nevo intradérmico de la mejilla (aumento de 20X).
- 5 La figura 77 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de nevo de unión de la piel (aumento de 20X).
- La figura 78 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de schwannoma (aumento de 10X).
- La figura 79 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe células de argentafina en el colon normal (aumento de 20X).
- 10 La figura 80 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe neuronas cerebrales normales (aumento de 20X).
- La figura 81 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe células mioepiteliales en glándulas mamarias normales (aumento de 20X).
- 15 La figura 82 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe la piel normal (aumento de 20X).
- La figura 83 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe la glándula salival normal (aumento de 20X).
- La figura 84 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe tejido mamario, posiblemente cáncer de mama.
- 20 La figura 85 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 que tiñe la misma muestra de mama de la figura 84. La tinción puede ser menos intensa que la observada con BC34 en la figura 84.
- La figura 86 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe tejido pulmonar, posiblemente adenocarcinoma de pulmón. La tinción puede ser reducida, o posiblemente estar ausente, de manera particular cuando se compara con la figura 87.
- 25 La figura 87 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 que tiñe la misma muestra de pulmón de la figura 86. La tinción citoplasmática se puede observar en esta muestra, en contraste con la tinción nuclear esperada para SOX10.
- La figura 88 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo del anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe melanoma. La tinción puede ser posiblemente más intensa que la observada en la figura 89.
- 30 La figura 89 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 que tiñe la misma muestra de melanoma de la figura 88. La tinción puede ser menos intensa que la observada con BC34 en la figura 88.
- La figura 90 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo del anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe melanoma. La tinción puede ser posiblemente más intensa que la observada en la figura 91.
- 35 La figura 91 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 que tiñe la misma muestra de mama de la figura 90. La tinción puede ser reducida, o posiblemente estar ausente, en comparación con la observada con BC34 en la figura 90.
- La figura 92 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe melanoma. La tinción puede ser posiblemente más intensa que la observada en la figura 93.
- 40 La figura 93 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 que tiñe la misma muestra de mama de la figura 92. La tinción puede ser reducida, o posiblemente estar ausente, en comparación con la observada con BC34 en la figura 92.
- La figura 94 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe vejiga normal. La tinción puede ser reducida, o posiblemente estar ausente, de manera particular cuando se compara con la figura 95.
- 45 La figura 95 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo RP anti-SOX10 que tiñe la misma muestra de vejiga de la figura 94. La tinción citoplasmática se puede observar en esta muestra, en contraste con la tinción nuclear esperada para SOX10.
- 50 La figura 96 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe carcinoides intestinales (aumento de 20X).
- La figura 97 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de rhabdomyosarcoma alveolar (aumento de 20X).
- 55 La figura 98 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de astrocitoma (aumento de 10X).
- La figura 99 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de cáncer de mama (aumento de 20X).
- La figura 100 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de leiomyosarcoma de grado II intermedio (aumento de 10X).
- 60 La figura 101 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma desmoplásico (aumento de 10X).
- La figura 102 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma desmoplásico (aumento de 20X).
- 65 La figura 103 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de schwannoma benigno (aumento de 10X).

La figura 104 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma de células fusiformes (aumento de 20X).

La figura 105 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma de células fusiformes (aumento de 10X).

5 La figura 106 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de anticuerpo BC34 anti-SOX10 que tiñe un caso de melanoma de células fusiformes (aumento de 20X).

La figura 107 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de un cóctel de anticuerpos de tirosinasa + MART-1 que tiñe un caso de melanoma.

10 La figura 108 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de [BC34] SOX10 que tiñe el mismo caso de melanoma que se muestra en la figura 39A.

La figura 109 muestra una versión en blanco y negro de un primer ejemplo de un cóctel de anticuerpos de SOX10 + tirosinasa + MART-1, que tiñe casos de melanoma.

La figura 110 muestra una versión en blanco y negro de un segundo ejemplo de un cóctel de anticuerpos de SOX10 + tirosinasa + MART-1 que tiñe casos de melanoma.

15 La figura 111 muestra una versión en color de un ejemplo de BC34 que tiñe un caso de melanoma.

La figura 112 muestra una versión en blanco y negro del mismo caso de melanoma que se muestra en la figura 111 teñido con un cóctel de tirosinasa + MART-1. Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción, aunque se pueden observar melanocitos pigmentados.

20 La figura 113 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de un cóctel de tirosinasa + MART-1 que tiñe un caso de melanoma.

La figura 114 muestra una versión en blanco y negro del mismo caso de melanoma que se muestra en la figura 113 teñido con BC34. Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.

La figura 115 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 que tiñe un caso de melanoma.

25 La figura 116 muestra una versión en blanco y negro del mismo caso de melanoma que se muestra en la figura 40A teñido con S100. Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.

La figura 117 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de ganglio linfático teñido con un cóctel de anticuerpos de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1. Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.

30 La figura 118 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de cerebro teñido con un cóctel de anticuerpos de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1. Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.

La figura 119 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de médula ósea teñida con un cóctel de anticuerpos de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1. Posiblemente, puede estar presente una tinción reducida o la ausencia de tinción.

35 La figura 120 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de tinción con S100 en el mismo caso de ganglio linfático que se muestra en la figura 117.

La figura 121 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de tinción con S100 en el mismo caso de cerebro que se muestra en la figura 118.

40 La figura 122 muestra una versión en blanco y negro de un ejemplo de tinción con S100 en el mismo caso de médula ósea que se muestra en la figura 119.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

45 Las realizaciones de la presente invención pueden dar a conocer anticuerpos monoclonales y procedimientos de los mismos que se unen específicamente a SOX10 y se pueden utilizar para la detección de SOX10 en el diagnóstico de diversos tipos de cánceres. El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de ratón. Los sistemas y procedimientos de la presente invención pueden relacionarse con el anticuerpo monoclonal o su porción de unión a antígeno capaz de unirse a SOX10.

50 Los anticuerpos monoclonales de ratón se pueden utilizar de manera habitual en procedimientos de inmunoensayo para identificar analitos específicos, incluso como anticuerpos primarios en procedimientos de inmunohistoquímica. Los anticuerpos monoclonales de ratón específicos para la proteína diana de interés se pueden producir utilizando procedimientos conocidos de manera general. En general, exponer un ratón al antígeno de interés (por ejemplo, un fragmento peptídico de la diana deseada o la diana proteica de longitud completa) puede inducir una respuesta inmunitaria en la que el ratón genera múltiples anticuerpos que se unen al antígeno, cada uno de los cuales puede ser producido por un linfocito B particular. Estos linfocitos B se pueden aislar del bazo de ratón y los anticuerpos producidos se pueden evaluar para determinar su idoneidad como anticuerpos primarios en IHC. Después de seleccionar el anticuerpo óptimo, el linfocito B asociado se puede fusionar con una célula tumoral utilizando procedimientos conocidos, lo que posiblemente de como resultado un hibridoma, una nueva línea celular que puede replicarse sin cesar y puede producir continuamente el anticuerpo deseado.

60 Los anticuerpos monoclonales pueden ser preferentes en ciertas realizaciones respecto a los anticuerpos policlonales por diversas razones. En particular, los anticuerpos monoclonales pueden derivarse de un único linfocito B y, como tal, pueden reconocer un único epítipo, lo que puede dar lugar a una mayor especificidad. Los anticuerpos monoclonales también se pueden generar de manera conveniente y reproducible en cultivo celular, lo

65

que posiblemente dé como resultado un suministro constante del anticuerpo deseado. Por supuesto, en otras realizaciones, se pueden utilizar anticuerpos policlonales.

5 Los anticuerpos anti-SOX10, tales como el anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón se pueden producir utilizando estos procedimientos generales y se puede evaluar su sensibilidad y especificidad por inmunohistoquímica en una variedad de tejidos normales y neoplásicos, posiblemente de manera particular en comparación con el anticuerpo RP anti-SOX10 conocido anteriormente.

10 **Ejemplo de expresión de la proteína SOX10:** una proteína recombinante SOX10 de la secuencia de aminoácidos 147 a 253 se puede clonar y expresar a partir de *E. coli*. Brevemente, el ADNc de SOX10 se puede clonar y purificar. El ADNc de SOX10 se puede digerir mediante enzimas de restricción y ligar al vector pET30a-GST. Las células BL21 se pueden transformar con la construcción. Se pueden seleccionar y secuenciar las colonias que expresan el tamaño correcto de proteína recombinante. Se puede realizar una producción adicional a mayor escala cultivando *E. coli* en medios LB que contienen IPTG, aproximadamente, 0,5 mM. La proteína recombinante SOX10 final se puede purificar y analizar mediante SDS-PAGE.

15 **Ejemplo de inmunización del huésped:** los ratones BALB/c hembra (de, aproximadamente, 6 a, aproximadamente, 8 semanas de edad) se pueden inmunizar por vía intraperitoneal (i.p.) con, aproximadamente, 100 µg de proteína SOX10 humana por ratón en adyuvante completo de Freund. Aproximadamente tres semanas más tarde, los ratones se pueden reforzar con otros, aproximadamente, 100 µg de SOX10 humana por ratón en adyuvante incompleto de Freund, aproximadamente, 4 veces más en intervalos de, aproximadamente, 3 semanas. Se puede desangrar a los ratones desde las colas, y los sueros se pueden recoger y almacenar a, aproximadamente, -20 °C para su posterior análisis de los títulos de anticuerpos mediante un ensayo de inmunoadsorción (ELISA).

20 **Ejemplo de hibridomas:** los anticuerpos que producen hibridoma para SOX10 se pueden generar mediante técnicas estándar a partir de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con SOX10. Por ejemplo, los esplenocitos de ratones inmunizados con SOX10 se pueden fusionar con células de mieloma P3-X63-Ag 8.653 (mieloma no secretor derivado de células de mieloma SP2/0 Balb/c) mediante incubación con, aproximadamente, el 50 % de polietilenglicol en una proporción de, aproximadamente, 4:1. Después de la incubación, las células pueden sedimentarse por centrifugación, posiblemente a, aproximadamente, 300 x g durante, aproximadamente, 10 minutos, lavarse en, aproximadamente, 25 ml de PBS, volver a centrifugarse, y el sedimento celular se puede resuspender en, aproximadamente, 100 ml de medio Dulbecco nuevo que contiene, aproximadamente, el 20 % de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, Utah). Se pueden añadir alícuotas de, aproximadamente, 100 µl a cada pocillo de diez placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning, Lowell, Massachusetts), aproximadamente, veinticuatro horas después, se pueden añadir, aproximadamente, 100 µl de medio de cultivo DMEM suplementado con hipoxantina (HT), aproximadamente, 1 M, aminopterina, aproximadamente, 4 mM y timidina (HAT), aproximadamente, 160 mM a cada pocillo de microtitulación. Los medios se pueden sustituir posiblemente después de, aproximadamente, 4 días con medios completos (que posiblemente contienen HAT y HT). Durante los siguientes 10 días, los medios se pueden eliminar y sustituir con medios nuevos con contenido reducido de HAT y HT o incluso sin las mismas. Los sobrenadantes de hibridoma se pueden seleccionar mediante ELISA para determinar la reactividad de los anticuerpos frente a SOX10, y los clones de hibridoma se pueden seleccionar y, posiblemente, estabilizar clonando dos veces mediante dilución limitante.

25 **Ejemplo de hibridomas:** los anticuerpos que producen hibridoma para SOX10 se pueden generar mediante técnicas estándar a partir de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con SOX10. Por ejemplo, los esplenocitos de ratones inmunizados con SOX10 se pueden fusionar con células de mieloma P3-X63-Ag 8.653 (mieloma no secretor derivado de células de mieloma SP2/0 Balb/c) mediante incubación con, aproximadamente, el 50 % de polietilenglicol en una proporción de, aproximadamente, 4:1. Después de la incubación, las células pueden sedimentarse por centrifugación, posiblemente a, aproximadamente, 300 x g durante, aproximadamente, 10 minutos, lavarse en, aproximadamente, 25 ml de PBS, volver a centrifugarse, y el sedimento celular se puede resuspender en, aproximadamente, 100 ml de medio Dulbecco nuevo que contiene, aproximadamente, el 20 % de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, Utah). Se pueden añadir alícuotas de, aproximadamente, 100 µl a cada pocillo de diez placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning, Lowell, Massachusetts), aproximadamente, veinticuatro horas después, se pueden añadir, aproximadamente, 100 µl de medio de cultivo DMEM suplementado con hipoxantina (HT), aproximadamente, 1 M, aminopterina, aproximadamente, 4 mM y timidina (HAT), aproximadamente, 160 mM a cada pocillo de microtitulación. Los medios se pueden sustituir posiblemente después de, aproximadamente, 4 días con medios completos (que posiblemente contienen HAT y HT). Durante los siguientes 10 días, los medios se pueden eliminar y sustituir con medios nuevos con contenido reducido de HAT y HT o incluso sin las mismas. Los sobrenadantes de hibridoma se pueden seleccionar mediante ELISA para determinar la reactividad de los anticuerpos frente a SOX10, y los clones de hibridoma se pueden seleccionar y, posiblemente, estabilizar clonando dos veces mediante dilución limitante.

30 Las células de hibridoma denominadas como clon BC34 de hibridoma SOX10 antihumano se han depositado en el Depósito de Patentes de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, de *American Type Culture Collection*) en Manassas, Virginia, el 11 de febrero de 2014 y han recibido la Designación de depósito de patente de ATCC No. PTA-120969, tal como se muestra en el anexo adjunto titulado "Certificado de depósito restringido de Budapest" que se incorpora en el presente documento como referencia. Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar un anticuerpo o fragmento del mismo producido mediante el hibridoma depositado en el ATCC e incluso pueden incluir un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal cultivando la célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal capaz de reconocer específicamente SOX10 e incluso permitir que el hibridoma produzca anticuerpos monoclonales.

35 **ELISA:** se pueden medir las respuestas inmunitarias del huésped antisuero a SOX10 mediante ELISA. Por ejemplo, se puede utilizar una solución de SOX10 (aproximadamente 1 µg/ml) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para revestir placas de poliestireno de fondo plano de, aproximadamente, 96 pocillos. Las placas se pueden bloquear con, aproximadamente, el 1 % de albúmina de suero bovino (BSA)-PBS. Se pueden añadir inmunoseros diluidos o sobrenadantes de hibridoma e incubar a, aproximadamente, 37 °C durante, aproximadamente, 1 hora. Después de lavar las placas con PBS, las placas se pueden incubar con reactivos anti-ratón-HRP de cabra (Jackson Labs). Las incubaciones se pueden realizar a, aproximadamente, 37 °C durante, aproximadamente, 30 minutos. Se puede añadir el sustrato ABTS para revelar el color y se puede medir la absorbancia a, aproximadamente, 405 nm (A405) en un lector de placas de microtitulación.

40 **Isotipo de anticuerpos monoclonales:** los anticuerpos anti-SOX10, tales como el anticuerpo monoclonal BC34 se pueden isotipar utilizando un kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón (Invitrogen, Carlsbad, California).

Por ejemplo, se pueden añadir, aproximadamente, 100 µl de sobrenadante de células [BC34] de anticuerpo monoclonal de ratón a las IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2B, IgG3, IgM e IgA anti-ratón de cabra revestidas en placa. Después de, aproximadamente, 30 minutos de incubación, la placa se puede lavar, aproximadamente, 3 veces con PBS y se puede incubar con reactivo Ig-HRP anti-ratón de cabra. Se puede añadir sustrato ABTS para revelar el color y se puede medir la absorbancia a, aproximadamente, 405 nm (A405) en un lector de placas de microtitulación. Se puede analizar el isotipo del clon BC34 y se puede identificar como IgG1/kappa de ratón.

Producción y purificación de anticuerpos: las células de hibridoma seleccionadas del clon BC34 se pueden cultivar con medio de cultivo DMEM suplementado con, aproximadamente, el 10 % de FBS o cualquier medio sin suero. Los sobrenadantes de cultivo se pueden purificar posteriormente mediante una columna de afinidad de proteína A. Las células de hibridoma se pueden inyectar también en ratones BALB/c cebados con pristano para producir ascitis de anticuerpos. La ascitis del anticuerpo se puede purificar posteriormente mediante una columna de afinidad de proteína A. La concentración de IgG se puede medir espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción para IgG de ratón de, aproximadamente, 1,4 a, aproximadamente, 280 nm. La pureza de la IgG se puede determinar mediante SDS-PAGE.

Transferencia Western: El anticuerpo [BC34] monoclonal purificado puede caracterizarse mediante transferencia Western. Los lisados celulares transfectados con SOX10 de longitud completa (Origene, Rockville, Maryland) pueden someterse a electroforesis en gel de proteína utilizando, aproximadamente, del 4 a, aproximadamente, el 12 % de SDS-PAGE con tampón Tris-glicina y se pueden transferir a filtros de nitrocelulosa en tampón Tris-glicina. Las proteínas en las transferencias se pueden visualizar incubando el anticuerpo BC34 durante, aproximadamente, 60 minutos a temperatura ambiente después de bloquear con tampón de bloqueo, seguido posiblemente de la incubación con inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa anti-ratón de cabra. Las transferencias se pueden detectar utilizando cromógeno TMB.

Determinación de las secuencias VH y VL: Se puede extraer el ARN total de los hibridomas utilizando el kit Qiagen (EE. UU., Gaithersburg, Maryland) según las instrucciones del fabricante. El ARN total de las células de hibridoma se transcribió de manera inversa en un volumen final de 20 µl que contenía una mezcla de 6 µM de cebador aleatorio (New England Biolabs Ipswich, Massachusetts), 0,5 mM de cada mezcla de nucleótidos dNTP (Life Technologies, Grand Island, Nueva York), DTT 5 mM (Invitrogen), 40 U de RNaseOUT® Recombinant RNase Inhibitor, y 200 U de transcriptasa inversa Superscript III (Life Technologies, Grand Island, Nueva York). Las reacciones de transcripción inversa (RT) se realizaron a 42 °C durante 5 minutos, 25 °C durante 10 minutos, 50 °C durante 60 minutos y 94 °C durante 5 minutos. Las regiones variables de Igh e Igk de ratón se amplificaron independientemente durante dos rondas de PCR anidada a partir de 1 µl de ADNc como plantilla. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20 µl que contenía 200 nM de cada cebador o mezcla total de cebadores (tabla 1), 300 µM de cada dNTP (Life Technologies, Grand Island, Nueva York) y 0,1 µl de ADN polimerasa Taq (Life Technologies, Grand Island, Nueva York). La primera ronda de PCR se realizó a 94 °C durante 15 minutos seguida de 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C (Igh) o 50 °C (Igk) durante 30 segundos, 72 °C durante 55 segundos e incubación final a 72 °C durante 10 minutos. La segunda ronda de PCR anidada se realizó con 1 µl de producto de PCR de primera ronda no purificado a 94 °C durante 15 minutos seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C (Igh) o 45 °C (Igk) durante 30 segundos, 72 °C durante 45 segundos e incubación final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2 % y se cortaron y purificaron utilizando el kit de purificación para PCR QIAquick (QIAGEN, Valencia, California). Los productos de PCR purificados se clonaron mediante el sistema de clonación TOPO TA (Life Technologies, Grand Island, Nueva York). Las 8 colonias se seleccionaron al azar y se cribaron mediante PCR de colonias con cebadores M13 directo e inverso. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN, Valencia, California) y se secuenciaron utilizando un iniciador de secuenciación del promotor T3 y se aplicó análisis de la base de datos IMGT (International ImMuno-Genetics)/V-QUEST para analizar las secuencias VH y VL y determinar las regiones determinantes complementarias (CDR) (tabla 2). (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/)

Tabla 1

Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'	
Igh 1ª PCR		
5' MsVHE	GGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG	SEQ ID NO: 12
3' Cγ1 exterior	GGAAGGTGTGCACACCGCTGGAC	SEQ ID NO: 13
3' Cγ2c exterior	GGAAGGTGTGCACACCACTGGAC	SEQ ID NO: 14
3' Cγ2b exterior	GGAAGGTGTGCACACTGCTGGAC	SEQ ID NO: 15
3' Cγ3 externo	AGACTGTGCGCACACCGCTGGAC	SEQ ID NO: 16
Igh 2ª PCR		
5' MsVHE	GGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG	SEQ ID NO: 17
3' Cγ1 interno	GCT CAG GGA AAT AGC CCT TGA C	SEQ ID NO: 18

Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'	
3' C γ 2c interior	GCT CAG GGA AAT AAC CCT TGA C	SEQ ID NO: 19
3' C γ 2b interior	ACT CAG GGA AGT AGC CCT TGA C	SEQ ID NO: 20
3' C γ 3 interior	GCT CAG GGA AGT AGC CTT TGA C	SEQ ID NO: 21
Igk 1^a PCR		
5' L-V κ 3	TGC TGC TGC TCT GGG TTC CAG	SEQ ID NO: 22
5' L-V κ 4	ATT WTC AGC TTC CTG CTA ATC	SEQ ID NO: 23
5' L-V κ 5	TTT TGC TTT TCT GGA TTY CAG	SEQ ID NO: 24
5' L-V κ 6	TCG TGT TKC TST GGT TGT CTG	SEQ ID NO: 25
5' L-V κ 6,8,9	ATG GAA TCA CAG RCY CWG GT	SEQ ID NO: 26
5' L-V κ 14	TCT TGT TGC TCT GGT TYC CAG	SEQ ID NO: 27
5' L-V κ 19	CAG TTC CTG GGG CTC TTG TTC	SEQ ID NO: 28
5' L-V κ 20	CTC ACT AGC TCT TCT CCT C	SEQ ID NO: 29
3' mC κ	GAT GGT GGG AAG ATG GAT ACA GTT	SEQ ID NO: 30
Igk 2^a PCR		
5' mV κ 3	GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA	SEQ ID NO: 31
3' P-mJK01	CGT TTG ATT TCC AGC TTG GTG	SEQ ID NO: 32
3' P-mJK02	CGT TTT ATT TCC AGC TTG GTC	SEQ ID NO: 33
3' P-mJK03	CGT TTT ATT TCC AAC TTT GTC	SEQ ID NO: 34
3' P-mJK04	CGT TTC AGC TCC AGC TTG GTC	SEQ ID NO: 35

Tabla 2

VH, CDR1: GFSLSTFLIG	SEQ ID NO: 6
VH, CDR2: IWWNDNK	SEQ ID NO: 7
VH, CDR3: VRMAGIGGTDAMDY	SEQ ID NO: 8
VL, CDR1: EIVEYYGTNL	SEQ ID NO: 9
VL, CDR2: AAS	SEQ ID NO: 10
VL, CDR3: QQSRKVPWT	SEQ ID NO: 11

5 Se secuenciaron dominios variables de BC34 para proporcionar polinucleótidos aislados que comprendían secuencias de ácido nucleico que codificaban las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se unía al epítipo de SOX10 QGGTAAIQAHYKSAH, identificado como SEQ ID NO: 3. La secuencia de la región variable de la cadena pesada se identifica como SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera se identifica como SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se identifica como SEQ ID NO: 4 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se identifica como SEQ ID NO: 5. El anticuerpo puede incluir un polipéptido que puede incluir la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2. El anticuerpo incluye un polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y/o la SEQ ID NO: 5. Un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 e incluso puede incluir una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. El anticuerpo incluye una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 e incluso incluye una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. El anticuerpo se une específicamente a, como mínimo, un polipéptido de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

20 Un anticuerpo puede tener una secuencia de aminoácidos, como mínimo, aproximadamente, el 70 % idéntica a una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2 y/o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Otros porcentajes pueden incluir, sin que constituyan limitación, como mínimo, aproximadamente, el 71 %, como mínimo, aproximadamente, el 72 %, como mínimo, aproximadamente, el 73 %, como mínimo, aproximadamente, el 74 %, como mínimo, aproximadamente, el 75 %, como mínimo, aproximadamente, el 76 %, como mínimo, aproximadamente, el 77 %, como mínimo, aproximadamente, el 78 %, como mínimo, aproximadamente, el 79 %, como mínimo, aproximadamente, el 80 %, como mínimo, aproximadamente, el 81 %, como mínimo, aproximadamente, el 82 %, como mínimo, aproximadamente, el 83 %, como mínimo, aproximadamente, el 84 %, como mínimo, aproximadamente, el 85 %, como mínimo, aproximadamente, el 86 %, como mínimo, aproximadamente, el 87 %, como mínimo, aproximadamente, el 88 %, como mínimo, aproximadamente, el 89 %, como mínimo, aproximadamente, el 90 %, como mínimo, aproximadamente, el 91 %, como mínimo, aproximadamente, el 92 %, como mínimo, aproximadamente, el 93 %, como mínimo, aproximadamente, el 94 %, como mínimo, aproximadamente, el 95 %, como mínimo, aproximadamente, el 96 %, como mínimo, aproximadamente, el 97 %, como mínimo, aproximadamente, el 98 % y, posiblemente incluso, como mínimo, aproximadamente, el 99 %, aproximadamente, el 70 %, aproximadamente, el 71 %, aproximadamente, el 72 %, aproximadamente, el 73 %, aproximadamente, el 74 %, aproximadamente, el 75 %, aproximadamente, el 76 %, aproximadamente, el 77 %, aproximadamente, el

78 %, aproximadamente, el 79 %, aproximadamente, el 80 %, aproximadamente, el 81 %, aproximadamente, el 82 %, aproximadamente, el 83 %, aproximadamente, el 84 %, aproximadamente, el 85 %, aproximadamente, el 86 %, aproximadamente, el 87 %, aproximadamente, el 88 %, aproximadamente, el 89 %, aproximadamente, el 90 %, aproximadamente, el 91 %, aproximadamente, el 92 %, aproximadamente, el 93 %, aproximadamente, el 94 %, aproximadamente, el 95 %, aproximadamente, el 96 %, aproximadamente, el 97 %, aproximadamente, el 98 %, aproximadamente, el 99 %, o similares.

El anticuerpo incluye un polipéptido de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 y/ 11. Un anticuerpo incluye una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 10 y/o 11 e incluso incluye una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8.

Mapeo de epítomos de la secuencia de unión de [BC34] anti-SOX10 de ratón: para determinar la secuencia peptídica de SOX10 que se reconoce por los anticuerpos anti-SOX10, tales como BC34, se puede realizar el mapeo de epítomos utilizando posiblemente dos ensayos: ELISA directo e incluso transferencia de punto. En un ensayo ELISA, la sensibilidad y especificidad del anticuerpo [BC34] anti-SOX10 puede determinarse midiendo el título de anticuerpos a, aproximadamente, 1:500 y, aproximadamente, 1:1.000. Los péptidos superpuestos a una longitud de, aproximadamente, 15 aminoácidos cada uno, que cubren la secuencia de la proteína SOX10 humana, posiblemente, de los aminoácidos desde 147 hasta 253, se pueden utilizar para determinar una secuencia de unión a BC34.

Se demostró que el epítopo para BC34 estaba incluido en los residuos de aminoácidos 196-211 de SOX10, que es QGGTAAIQAHYKSAH, identificada como la SEQ ID NO: 3. El epítopo del anticuerpo monoclonal SOX10 de ratón, o una porción del mismo, puede ser un antígeno útil para la producción de nuevos anticuerpos monoclonales, incluida la producción en especies distintas del ratón (por ejemplo, conejo, cabra, caballo, pollo, etc.). Por supuesto, un anticuerpo policlonal puede unirse específicamente a un epítopo en la SEQ ID NO: 3, que se relaciona con los residuos 196-211 de la proteína SOX10.

Para el protocolo de ELISA directo, las placas se pueden revestir en primer lugar con, aproximadamente, 100 µl de péptidos SOX10 a, aproximadamente, 5 µg/ml en tampón de revestimiento (pH, aproximadamente, 9,5) durante la noche a, aproximadamente, 4 °C, seguido de bloqueo (aproximadamente 3 % de BSA) a, aproximadamente, 200 µl/pocillo durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se pueden incubar con anticuerpo para SOX10 purificado a, aproximadamente, 100 ng/ml y, aproximadamente, 200 ng/ml por separado durante, aproximadamente, 1 hora a, aproximadamente, temperatura ambiente en un agitador de placas ELISA. Posteriormente, las placas se pueden lavar, posiblemente, cinco veces con PBST (aproximadamente 300 µl/pocillo) seguido de la adición de IgG-HRP anti-ratón de cabra a las placas e incubación durante, aproximadamente, 1 hora en un agitador de placas. Las placas se pueden lavar, a continuación, con PBST (aproximadamente 300 µl/pocillo) y secar, y se puede añadir TMB a, aproximadamente, 100 µl/pocillo, revelar durante, aproximadamente, 5 minutos en un agitador, e incluso se puede seguir con una solución de detención (aproximadamente 50 µl/pocillo). La absorbancia se puede medir a, aproximadamente, 450 nm en un lector de placas ELISA, posiblemente según las recomendaciones del fabricante.

Para el ensayo de transferencia de punto, una membrana de nitrocelulosa puede transferirse con, aproximadamente, 1 µl a una concentración de, aproximadamente, 1 mg/ml del péptido, cuadruplicados por péptido. Esta membrana puede incubarse durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente hasta que esté completamente seca. La membrana se puede bloquear con, aproximadamente, el 3 % de BSA en TBST (por ejemplo, Tris, aproximadamente, 50 mM, NaCl, aproximadamente, 0,5 M, Tween-20, aproximadamente, el 0,05 %, pH, aproximadamente, 7,4) durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente el anticuerpo [BC34] anti-SOX10 de ratón se puede añadir a, aproximadamente, 200 ng/ml durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente en TBST. Posteriormente, la membrana se puede lavar durante, aproximadamente, 3 veces (aproximadamente 10 minutos cada vez) en TBST en un agitador orbital, seguido de incubación con anticuerpo secundario IgG1-AP anti-ratón de cabra durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente en TBST. La membrana se puede lavar, aproximadamente, 3 veces (aproximadamente 10 minutos cada vez) en TBST en un agitador. La unión puede detectarse añadiendo reactivos de detección quimioluminiscentes Western Glo y exponiéndolos a una película.

Procedimiento IHC con BC34 anti-SOX10: la inmunohistoquímica que utiliza anticuerpos anti-SOX10, tales como el anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón se puede realizar en muestras de tejido incluidas en parafina fijadas en formalina (FFPE, de "formalin fixed paraffin embedded") utilizando procedimientos conocidos de manera general por los expertos en la materia, tales como los ejemplificados de manera general por los siguientes ejemplos no limitantes (por ejemplo, lavados con solución salina tamponada con Tris, pH, aproximadamente, 7,6, entre etapas):

- 1) Se pueden montar secciones (~5 µm) de tejidos incluidos en parafina fijados con formalina en portaobjetos de microscopio disponibles en el mercado, posiblemente revestidos con polilisina.
- 2) Las secciones se pueden desparafinar (utilizando xilenos o un sustituto de xileno) y se pueden rehidratar posiblemente a través de una serie de soluciones de alcohol/agua, seguido posiblemente por el bloqueo de

las peroxidasas endógenas, posiblemente, con una solución de peróxido de hidrógeno al 3 %, aproximadamente.

3) Las muestras pueden someterse a recuperación de antígeno inducida por calor utilizando un tampón de citrato en una olla a presión (Diva, Decloaking Chamber; Biocare Medical) y se pueden calentar a, aproximadamente, 125 °C durante, aproximadamente, 30 segundos. [Otros procedimientos de recuperación de antígeno conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, vaporizador, horno microondas, enzima o similares) también pueden ser aceptables]. Se puede dejar que los tejidos se enfríen durante unos 10 minutos y posteriormente se pueden enjuagar con agua desionizada.

4) Se puede aplicar una solución de bloqueo de proteínas (Background Punisher, Biocare Medical) al tejido durante, aproximadamente, 10 minutos.

5) El anticuerpo BC34 para SOX10 se puede aplicar en una solución tamponada con tris (pH, aproximadamente, 6,2) con albúmina de suero bovino como proteína transportadora durante, aproximadamente, 30 minutos. El anticuerpo BC34 para SOX10 puede diluirse posiblemente a 1:10.000.

6) La detección del anticuerpo para SOX10 posiblemente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Detección de Polímero-HRP-Ratón MACH 2, Biocare Medical) se puede conseguir mediante la aplicación de conjugado anti-ratón-HRP de cabra durante, aproximadamente, 30 minutos. En otro ejemplo, la detección del anticuerpo para SOX10 posiblemente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Detección de Polímero-HRP MACH 4 Universal, Biocare Medical) se puede conseguir en dos etapas. Una aplicación inicial de un anticuerpo IgG anti-ratón de conejo durante, aproximadamente, 10 minutos puede ser seguida por incubación con un conjugado anti-conejo-HRP de cabra durante, aproximadamente, 10 minutos.

7) Posiblemente, en una etapa de detección final, se puede aplicar 3,3'-diaminobencidina (DAB) en tampón que posiblemente contenga, aproximadamente, el 0,02 % de peróxido de hidrógeno (Betazoid DAB, Biocare Medical). La oxidación de DAB a través de un mecanismo mediado por HRP puede dar como resultado la precipitación de un producto cromógeno marrón, lo que posiblemente permita la identificación de sitios de expresión de SOX10.

8) Los portaobjetos se pueden contrateñir brevemente, posiblemente, en una hematoxilina de Mayer modificada.

Procedimiento IHC con BC34 anti-SOX10 utilizando detección de fosfatasa alcalina y cromógeno: Se puede realizar también IHC que utiliza BC34 tal como se ha descrito anteriormente, utilizando un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (AP) y un cromógeno Fast Red. Por ejemplo, la detección del anticuerpo SOX10 posiblemente con un anticuerpo secundario conjugado con AP (Detección de Polímero-AP de ratón MACH 2, Biocare Medical) se puede conseguir mediante la aplicación de conjugado anti-ratón-AP de cabra durante, aproximadamente, 30 minutos. Posiblemente, en una etapa de detección final, se puede aplicar una sal de fosfato de naftol (por ejemplo, fosfato de naftol AS-TR) y una sal de diazonio (por ejemplo, Fast Red KL) en tampón (Vulcan Fast Red, Biocare Medical). La escisión del fosfato por la fosfatasa alcalina, seguida de la reacción del naftol resultante con la sal de diazonio puede dar como resultado la precipitación de un producto cromógeno rojo, lo que posiblemente permita la identificación de sitios de expresión de SOX10.

Procedimiento IHC con el anticuerpo BC34 para SOX10, el anticuerpo tirosinasa T311 y los anticuerpos MART-1 M2-7C10 y M2-9E3: Se puede realizar IHC tal como se ha descrito anteriormente utilizando un cóctel de anticuerpos primarios compuesto posiblemente por [BC34] para SOX10, anticuerpo tirosinasa [T311] y posiblemente incluso anticuerpos MART-1 [M2-7C10] y [M2-9E3]. La detección de cada anticuerpo se puede conseguir con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Detección de Polímero-HRP Universal MACH 4, Biocare Medical) posiblemente en dos etapas. Una aplicación inicial de un anticuerpo IgG anti-ratón de conejo durante, aproximadamente, 10 minutos puede ser seguida por incubación con un conjugado anti-conejo-HRP de cabra durante, aproximadamente, 10 minutos, seguido de visualización con DAB.

Resultados de la tinción IHC con el anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón:

Utilizando el protocolo anterior, se evaluó la expresión de SOX10 en una variedad de tejidos normales y neoplásicos utilizando BC34 y en algunos casos se comparó con patrones de tinción utilizando un anticuerpo RP anti-SOX10. Se optimizó el título de todos los anticuerpos (por ejemplo, la concentración) utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se evaluaron diversos títulos de anticuerpos para maximizar la intensidad de tinción, posiblemente mientras se minimiza o incluso se elimina la tinción de fondo. Para cada anticuerpo, se utilizó el título que proporcionó la máxima intensidad de tinción, posiblemente con la mínima tinción de fondo.

La tinción con BC34 se puede observar en diversos casos de melanoma, tal como se muestra en las figuras 1-3 y 63-65. De hecho, el melanoma metastásico al ganglio linfático puede identificarse también mediante BC34 (figuras 4 y 66). En algunos casos, de manera particular en casos de melanoma, en los que pueden estar presentes pigmentos endógenos de melanocitos, puede ser ventajosa la tinción con un cromógeno rojo. BC34 puede teñir casos de melanoma de células en globo (figuras 5 y 67), melanoma epiteloide (figuras 6 y 68), melanoma perivascular (figuras 8-9 y 70-71), melanoma rabdoide (figuras 10 y 72), melanoma sarcomatoide (figuras 11 y 73), y melanoma plasmacitoide (figuras 12 y 74).

La tinción con BC34 también se puede observar en tumores de nervios periféricos (figuras 7 y 69), así como en casos de nevo (figuras 13-15 y 75-77). Los schwannomas también se pueden teñir con BC34 (figuras 16 y 78).

5 En los tejidos normales, las células de argentafina en el colon normal, las neuronas cerebrales normales, las células mioepiteliales de las glándulas mamarias, la piel normal y las glándulas salivales normales se pueden teñir con BC34 (figuras 17-21 y 79-83).

10 La tinción con BC34 puede ser superior a la del anticuerpo RP anti-SOX10, de manera particular en los casos en los que BC34 exhibe una mayor sensibilidad, o posiblemente una mayor intensidad de tinción, así como en los casos en los que BC34 es posiblemente más específico. Por ejemplo, BC34 puede exhibir una tinción más intensa en casos de cáncer de mama (figuras 22 y 84), en comparación con el anticuerpo RP anti-SOX10 (figuras 23 y 85).

15 En el adenocarcinoma de pulmón, BC34 puede demostrar una especificidad mejorada en comparación con el anticuerpo RP anti-SOX10. Por ejemplo, la tinción con BC34 puede reducirse, o posiblemente estar ausente (figuras 24 y 86), en los casos en que el anticuerpo RP anti-SOX10 produce tinción citoplasmática, que no sería consistente con la expresión de SOX10 (figuras 25 y 87).

20 Los casos de melanoma también pueden mostrar una tinción más intensa con BC34 (figuras 26, 28, 30, 88, 90 y 92), en comparación con la del anticuerpo RP anti-SOX10 en las mismas muestras, en las que la tinción puede reducirse, o incluso posiblemente estar ausente, cuando se utiliza el anticuerpo RP anti-SOX10 (figuras 27, 29, 31, 89, 91, 93).

25 En la vejiga normal, BC34 puede demostrar una especificidad mejorada en comparación con el anticuerpo RP anti-SOX10. Por ejemplo, la tinción con BC34 puede reducirse, o posiblemente estar ausente (figuras 32 y 94), en los casos en los que el anticuerpo RP anti-SOX10 produce tinción citoplasmática, que no sería consistente con la expresión de SOX10 (figuras 33 y 95).

30 BC34 también puede teñir otros tejidos neoplásicos, incluidos posiblemente los carcinoides intestinales (figuras 34 y 96), rabdomiosarcoma de alveolo (figuras 35 y 97), astrocitoma (figuras 36 y 98), cáncer de mama (figuras 37 y 99), leiomiomasarcoma (figuras 38 y 100). BC34 puede teñir también el schwannoma benigno (figuras 41 y 103).

La tinción con BC34 también se puede observar en melanomas desmoplásicos (figuras 33-34) y melanomas de células fusiformes (figuras 42-44 y 104-106).

35 El melanoma se puede teñir también con tirosinasa y MART-1, que incluye un cóctel de tirosinasa + MART-1 (figuras 45 y 107). BC34 también puede teñir los mismos casos de melanoma (figuras 46 y 108). Un cóctel de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 puede teñir el melanoma (figuras 47, 48, 109, 110) y posiblemente sea más sensible que S100 solo, o tirosinasa + MART-1 solos (tabla 4). En los casos como los que se muestran en las figuras 48 y 110, SOX10 y tirosinasa + MART-1 pueden teñir diferentes áreas del tumor, que pueden identificarse por la tinción nuclear de SOX10 y la tinción citoplasmática de tirosinasa + MART-1. La tinción diferencial en un tumor puede indicar la presencia de más de un clon en el tumor.

45 Algunos casos de melanoma se pueden teñir con BC34 (figuras 49 y 111), pero, posiblemente, no con tirosinasa + MART-1 (figuras 50 y 112). Otros casos de melanoma se pueden teñir con tirosinasa + MART-1 (figuras 51 y 113), pero, posiblemente, no con BC34 (figuras 52 y 114).

50 El cóctel de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 puede teñir casos de melanoma que posiblemente no estén teñidos con S100 (figuras 53, 54, 115 y 116). De esta manera, el cóctel de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 puede ser más sensible que S100.

55 El cóctel de [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 también puede ser más específico que S100. [BC34] SOX10 + tirosinasa + MART-1 no tiñe los ganglios linfáticos, el cerebro o la médula ósea (figuras 55-57 y 117-119). Una desventaja de S100 es la tinción observada en tejidos distintos al melanoma, incluidos los ganglios linfáticos, el cerebro y la médula ósea normales (figuras 58-60 y 120-122). Los ganglios linfáticos, el cerebro y la médula ósea pueden ser sitios comunes para metástasis de melanoma. La tinción de S100 en estos tejidos normales puede dificultar el diagnóstico, de manera particular cuando un patólogo intenta identificar una pequeña metástasis, o incluso puede dar como resultado un diagnóstico incorrecto.

60 El anticuerpo [BC34] anti-SOX10 se evaluó por IHC en una variedad de tejidos normales y neoplásicos. Normalmente, se utilizó un límite de $\geq 5\%$, aproximadamente, de tinción de células tumorales como criterio para determinar un caso como "positivo" para SOX10 y, por el contrario, $< 5\%$, aproximadamente, de tinción de células tumorales como criterio para determinar un caso como "negativo".

65 En tejidos normales (n = 34), BC34 tiñó melanocitos dérmicos, células mioepiteliales en mama y glándulas salivales, nervios periféricos y cerebro (tabla 3). BC34 también tiñó las células de argentafina en todo el tracto digestivo. BC34

tiñó 200/219 (91,3 %) melanomas (tabla 4). En particular, 23/24 (95,8 %) de células fusiformes y melanomas desmoplásicos fueron positivos para SOX10. Además, hubo un 100 % de tinción para schwannomas y nevos.

5 En las neoplasias ensayadas (n = 587), SOX10 se expresó en 18/109 (16,5 %) de cánceres de mama ductales infiltrantes, y en ninguno de los siguientes (n = 426) otros carcinomas, que incluían pulmón, colon, próstata, vejiga, riñón, hepático, esófago, ovario, tiroideo, suprarrenal y seminoma testicular (tabla 5). SOX10 fue positivo en 2/21 rabdomyosarcomas, en 1/21 de leiomyosarcomas y en el 35 % de los gliomas del SNC. Los tumores carcinoides en el tracto digestivo y en el pulmón fueron todos negativos, excepto por la tinción de células sustentaculares.

10 En los melanomas, un cóctel de SOX10, tirosinasa y MART-1 puede ser más sensible que SOX10 solo, S100 solo, o incluso el cóctel de tirosinasa + MART-1 (tabla 6). La tinción de tirosinasa y MART-1 puede ser citoplasmática (figura 39A) y la tinción de SOX10 puede ser nuclear (figuras 46 y 108). El cóctel de SOX10 + tirosinasa + MART-1 puede mostrar una combinación de tinción nuclear (SOX10) y tinción citoplasmática (MART-1 y tirosinasa) (figuras 47, 48, 109, 110). En algunos casos, SOX10 puede ser positivo y tirosinasa + MART-1 puede ser negativo (figuras 49, 50, 111 y 112), o viceversa (figuras 51, 52, 113 y 114). El cóctel de SOX10 + tirosinasa + MART-1 puede ser positivo en los casos en los que S100 es negativo (figuras 53, 54, 115, 116). Se descubrió que un caso es posiblemente positivo para S100 y negativo para SOX10 + tirosinasa + MART-1. [BC34] SOX10 también puede ser negativo en los ganglios linfáticos, el cerebro y la médula ósea (figuras 55-57 y 117-119), mientras que S100 puede teñir estos tejidos (figuras 58-60 y 120-122).

20

Tabla 3: Tipos de tejidos normales (n = 34)

Órgano	SOX10 (+)	Órgano	SOX10(+)
Cerebro	+	Estómago*	-
Cerebelo	+	Intestino delgado	-
Suprarrenal	-	Colon*	-
Ovario	-	Hígado	-
Páncreas*	-	Glándula salival	+
Tiroides	-	Riñón	-
Paratiroides*	-	Próstata	-
Testículos	-	Útero	-
Hueso	-	Cuello uterino	-
Bazo	-	Músculo estriado	-
Amígdalas	-	Piel	+
Timo	-	Nervio (periférico)	+
Médula ósea	-	Pulmón	-
Pulmón	-	Laringe	-
Cardíaco	-	Vejiga	-
Esófago	-	Placenta	-
Pituitaria	-	Mesotelio	-

* Algunas células de argentafina en todo el tracto digestivo y/o algunas células de tipo neuroendocrino dispersas se tiñeron para SOX10.

Tabla 4: melanoma

Melanoma	Casos	SOX10 (+)	%(+)
Melanoma (piel)	109	105	96
Melanoma metastásico	86	72	83,7
Melanoma de células fusiformes	9	9	100
Melanoma desmoplásico	13	12	92,3
Células de características mixtas desmoplásicas/fusiformes	2	2	100
Melanoma epiteliode	2	2	100
Melanoma sarcomatoide	2	2	100
Melanoma plasmocitoide	2	2	100
Melanoma de células en globo	2	2	100
Melanoma rabdoideo 1	1	1	100
Schwannoma (neurilemmoma)	28	28	100
Nevo	20	20	100

25

Tabla 5: Diversos tejidos neoplásicos (n = 587)

Cánceres	Nº de casos	SOX10 +	% (+)
Pulmón	178	0	0
Colon	24	0	0
Mama	109	18	16,5
Próstata	13	0	0
Vejiga	48	0	0

Cánceres	Nº de casos	SOX10 +	% (+)
Riñón	15	0	0
Hígado	57	0	0
Esófago	10	0	0
Seminoma	17	0	0
Ovárico	12	0	0
Glándula suprarrenal	10	0	0
Tiroides (papilar)	4	0	0
Leiomioma	21	2	9,5
Rabdomiosarcoma	21	1	4,8
Cerebro	29*	51	57
Páncreas	14	0	14
Linfoma	5	0	0
Carcinoides	8	0**	0
Cuello uterino	11	0	0

*SOX10 se expresó principalmente en astrocitoma (24/39) y en casos limitados de glioblastoma, meduloblastoma y ependimoma maligno. **(<1%)

Tabla 6: comparación de SOX10, S100, tirosinasa + MART-1 y tirosinasa + MART-1 + SOX10

Anticuerpo o cóctel de anticuerpos	Casos positivos de melanoma/Casos totales (% positivo)
S100	60/80 (75 %)
SOX10	64/80 (80 %)
tirosinasa + MART-1	71/80 (89 %)
SOX-10 tirosinasa + MART-1	73/80 (91 %)

5 Estos ejemplos demuestran las ventajas de BC34 y muestran, posiblemente, que BC34 tiene diversas ventajas respecto a los anticuerpos conocidos, incluida una sensibilidad o especificidad superior, que posiblemente da como resultado patrones de tinción más limpios, con menos tinción de fondo o citoplasmática indeseable.

10 En algunas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos anti-SOX10, tales como el anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón pueden ser adecuados para utilizar en muchas variaciones de los protocolos anteriores y otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Las muestras teñidas con BC34 pueden archivarse utilizando un medio de montaje permanente y un cubreobjetos. El anticuerpo BC34 se puede utilizar también en un instrumento de tinción automatizado, utilizando protocolos estándar. También se puede imaginar la utilización de muchos procedimientos de detección alternativos (por ejemplo, fluorescencia), enzimas de detección (por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa o similares) y posiblemente incluso cromógenos (por ejemplo, 3-amino-9-etilcarbazol, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido, o similares), conocidos de manera general por los expertos en la materia.

20 Un epítipo de un anticuerpo anti-SOX10, tal como el anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón, o una porción del mismo, puede ser un antígeno útil para la producción de nuevos anticuerpos monoclonales, incluida la producción en especies distintas del ratón (por ejemplo, conejo, cabra, caballo, pollo, etc.) tal como entendería un experto en la materia. De hecho, el epítipo particular de BC34 puede ser una de las características que contribuya a sus propiedades ventajosas.

25 Si bien en el presente documento se puede describir la utilización de anticuerpos anti-SOX10, tales como BC34 en la inmunohistoquímica de tejidos incluidos en parafina fijados con formalina, se puede concebir fácilmente su utilidad en otros inmunoensayos y se pretende que queden incluidos en la presente solicitud. En particular, puede ser bien sabido que muchos de los mismos reactivos utilizados en IHC de FFPE también se pueden utilizar en IHC de secciones de tejido congelado. Los anticuerpos anti-SOX10, tales como BC34 también pueden ser útiles en otros inmunoensayos, incluido ELISA, utilizando posiblemente procedimientos conocidos de manera general.

30 En otro aspecto de la presente invención, posiblemente relacionado con la IHC, un anticuerpo anti-SOX10 de la presente invención se puede utilizar junto con uno o más anticuerpos primarios adicionales como parte de un cóctel, para realizar un procedimiento de "doble tinción" (también descrito como multitinción o incluso multiplex). Estos procedimientos de "doble tinción" pueden ser bien conocidos de manera general en la técnica; sin embargo, las mejores combinaciones de anticuerpos primarios para una aplicación de diagnóstico particular pueden no ser conocidas.

40 En este procedimiento, los anticuerpos anti-SOX10, tales como un anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón podrían combinarse con uno o más anticuerpos en un único cóctel de anticuerpos primarios, posiblemente adecuado para la aplicación simultánea a una muestra. Los anticuerpos pueden derivarse de un huésped de ratón o un huésped de conejo o similar. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. En realizaciones, se puede utilizar un cóctel de anticuerpos en un procedimiento IHC de doble tinción para producir dos o más tinciones coloreadas que pueden identificar la presencia o ausencia de antígenos proteicos diana en la muestra de tejido. Por ejemplo, en

realizaciones donde un cóctel de anticuerpos puede estar compuesto por anticuerpos de ratón y conejo, un sistema de detección puede incluir un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y posiblemente incluso se puede utilizar un anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) para producir la tinción de dos colores. Se puede utilizar 3,3'-diaminobencidina (DAB) para producir una tinción marrón, posiblemente facilitada por HRP, y ésta puede identificar la presencia o ausencia, y/o ubicación, de anticuerpos de ratón unidos en la muestra; se puede utilizar Fast Red para producir una tinción fucsia/roja, posiblemente facilitada por AP, y ésta puede identificar la presencia o ausencia, y/o ubicación, de anticuerpos de conejo en la muestra. En otras realizaciones, un sistema de detección puede incluir un anticuerpo anti-ratón conjugado con AP y un anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP que se puede utilizar para producir una tinción de dos colores que puede identificar la presencia o ausencia, y/o ubicación, de los anticuerpos de ratón con una tinción roja y los anticuerpos de conejo con una tinción marrón, posiblemente cuando se puedan utilizar Fast Red y DAB como cromógenos. En algunas realizaciones, se puede aplicar un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP y posiblemente un anticuerpo anti-conejo conjugado con AP a la muestra como un cóctel, en una única solución, o se pueden aplicar en etapas separadas y secuenciales.

Los anticuerpos anti-ratón o anti-conejo que comprenden los conjugados anticuerpo-enzima pueden derivarse de una especie huésped diferente, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, ratón, conejo, pollo, caballo, rata, cabra, oveja o similares. Un anticuerpo primario puede ser de una variedad de especies huésped, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, ratón, conejo, pollo, caballo, rata, cabra, oveja o similares. En las realizaciones, un anticuerpo puede incluir un conjugado anticuerpo-enzima y se podría obtener un anticuerpo primario de dos especies huésped diferentes. También se pueden utilizar cromógenos que no sean DAB y/o Fast Red.

Son posibles múltiples alternativas a un procedimiento de doble tinción, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, la utilización de más de dos anticuerpos, la utilización de especies que no sean ratón y conejo, otros cromógenos y sistemas de detección, un orden diferente de etapas de detección y, posiblemente incluso modificaciones que dan como resultado tres o más colores (que pueden requerir una etapa de desnaturalización).

En algunas realizaciones, se puede utilizar una única tinción de color para un cóctel de anticuerpos primarios. En un ejemplo, si el cóctel de anticuerpos primario está compuesto por anticuerpos todos derivados de la misma especie huésped, entonces se puede utilizar un único sistema de detección para teñir la presencia de todos los anticuerpos con un solo color. La presencia o ausencia de cada anticuerpo puede determinarse en función de la localización celular, o posiblemente esta determinación no es necesaria y la tinción puede interpretarse eficazmente sin identificar la presencia o ausencia de cada anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón puede combinarse con anti-MART1 monoclonal de ratón en un cóctel de anticuerpos primario y utilizarse en un procedimiento IHC con detección de HRP conjugada con anti-ratón y DAB para visualización, para producir una tinción marrón. En otro aspecto, un cóctel de anticuerpos primarios compuesto por dos o más anticuerpos de diferentes especies huésped se puede utilizar de manera similar para producir una tinción de un solo color. Por ejemplo, el BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón se puede combinar con el anticuerpo anti-S100 policlonal de conejo y utilizarse en un procedimiento IHC con HRP conjugada con anti-ratón y HRP conjugada con anti-conejo, y DAB para visualización, para producir una tinción marrón.

Ciertas etapas de un procedimiento IHC se pueden realizar de forma secuencial o simultánea, posiblemente mediante la utilización de un cóctel de reactivos, como saben los expertos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en un cóctel de anticuerpos primarios pueden aplicarse alternativamente en etapas secuenciales de uno o más anticuerpos. De manera similar, los reactivos de detección pueden aplicarse simultáneamente en cóctel de reactivos o reactivos separados en etapas secuenciales.

Entre los anticuerpos que pueden ser útiles para el diagnóstico cuando se combinan con un anticuerpo anti-SOX10, tal como un anticuerpo monoclonal anti-SOX10 de ratón BC34 en un cóctel de anticuerpos primario para utilizar en procedimientos de tinción múltiple se incluyen:

Combinación de anticuerpos y (Especies huésped)	Patrón de tinción posible (localización celular, color y tinción*)	Utilidad diagnóstica posible
[BC34] SOX10 (Ratón)	SOX10 (Nuclear, marrón)	La tinción de SOX10 se puede observar en el melanoma;
S100 (Conejo)	S100 (citoplasmática y nuclear, roja)	La tinción de S100 se puede observar en el melanoma

*El color listado de cada tinción puede ser el resultado de un sistema de detección que puede incluir un anticuerpo anti-ratón conjugado posiblemente con HRP e incluso un anticuerpo anti-conejo conjugado posiblemente con AP, posiblemente incluso con DAB y Fast Red como cromógenos, que puede dar como resultado una tinción marrón para anticuerpos de ratón y una tinción roja para anticuerpos de conejo. Alternativamente, el sistema de detección puede incluir un anticuerpo anti-ratón conjugado posiblemente con AP e incluso un anticuerpo anti-conejo conjugado posiblemente con HRP, posiblemente incluso con DAB y Fast Red como cromógenos, que puede dar como resultado una tinción roja para anticuerpos de ratón y una tinción marrón para los anticuerpos de conejo. Se pueden obtener otras combinaciones de colores utilizando otros sistemas de detección o cromógenos y se pretende que todos estén incluidos en la presente divulgación.

En algunas realizaciones, los reactivos pueden aplicarse secuencialmente para producir una doble tinción, posiblemente incluso cuando se utilizan anticuerpos de la misma especie de huésped. Por ejemplo, podría aplicarse BC34 monoclonal de ratón, seguido de posiblemente detección de HRP anti-ratón y etapas de cromógeno DAB.

5 Después de una etapa de desnaturalización, utilizando posiblemente una solución ácida, se puede aplicar un segundo anticuerpo monoclonal de ratón, posiblemente un anticuerpo anti-nectina monoclonal de ratón o un anticuerpo anti-MART1 monoclonal de ratón, posiblemente seguido de etapas de detección de AP-anti-ratón y cromógeno Fast Red, para producir una tinción de dos colores.

10 En algunas realizaciones, se puede utilizar un cóctel de anticuerpos derivados de la misma especie huésped, dando como resultado una única tinción de color. Por ejemplo, se puede aplicar un cóctel de [BC34] SOX10 monoclonal de ratón, tirosinasa [T311] monoclonal de ratón y MART-1 [M2-7C10] y [M2-9E3] monoclonales de ratón y detectar mediante anti-ratón-HRP y DAB, o posiblemente anti-ratón-AP y Fast Red. Otras realizaciones pueden incluir un cóctel de anticuerpos de SOX10 y tirosinasa, o posiblemente SOX10 y MART-1. El SOX10 monoclonal de ratón
 15 también se puede combinar con anticuerpos tirosinasa o MART-1 policlonales o monoclonales de conejo en cualquiera de las combinaciones descritas anteriormente, posiblemente incluso en un procedimiento de doble tinción. Los cócteles de anticuerpos de SOX10, tirosinasa y/o MART-1 pueden ser superiores a otros marcadores potenciales de melanoma, incluido posiblemente S100. SOX10, tirosinasa y MART-1 pueden ser más sensibles que S100 en el melanoma, posiblemente porque SOX10 puede teñir el melanoma desmoplásico y el melanoma de células fusiformes y S100 puede no teñir estos tipos. SOX10, tirosinasa y MART-1 también pueden ser más
 20 específicos que S100, dado que no pueden teñir el cerebro, los ganglios linfáticos o la médula ósea, sitios comunes para metástasis de melanoma, de la forma en que lo hace S100, posiblemente ayudando en la identificación de micrometástasis en estos sitios. En ciertas realizaciones, los clones distintos de los utilizados en los ejemplos (incluidos otros clones de SOX10 distintos de BC34) pueden ser adecuados y posiblemente intercambiables, o
 25 posiblemente incluso superiores a los clones utilizados en los ejemplos.

En muchas realizaciones, los anticuerpos que se unen a marcadores de citoqueratina se pueden utilizar en diferentes combinaciones y, en algunos casos, indistintamente, como conocen los expertos en la materia. Por ejemplo, CK5 puede ser intercambiable con CK5/6 o CK5/14. De manera similar, HMWCK (citoqueratina de alto
 30 peso molecular, de high molecular weight cytokeratin) se puede utilizar indistintamente con CK5/6 o CK5/14.

En muchos casos, el diagnóstico se puede realizar a menudo sobre muestras de tejido limitadas de citología o una biopsia, y puede ser importante conservar el tejido para pruebas moleculares adicionales; por lo tanto, puede ser preferente un enfoque eficiente para el diagnóstico que consuma un mínimo de tejido, pero que proporcione una
 35 especificidad y/o sensibilidad óptimas. Puede ser preferente un procedimiento que proporcione información de diagnóstico útil, mientras consume un mínimo de tejido de la muestra, posiblemente mediante la utilización de un cóctel de anticuerpos, o posiblemente por las características de sensibilidad o especificidad mejoradas.

Un anticuerpo anti-SOX10, tal como un anticuerpo BC34 anti-SOX10 monoclonal de ratón puede ser específico para la detección de SOX10 y puede ser útil en procedimientos inmunohistoquímicos para el diagnóstico de diversos tipos de cánceres en muestras de tejido humano. En particular, el anticuerpo anti-SOX10, tal como BC34 puede tener ventajas respecto al anticuerpo anti-SOX10 RP, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, una mayor
 40 sensibilidad, una tinción más intensa, una mayor especificidad y una tinción más limpia, con posiblemente menos tinción de fondo, así como posiblemente una falta de tinción de carcinoides y posiblemente falta de tinción de adenocarcinoma de pulmón.
 45

Como solo un ejemplo de un procedimiento de inmunoensayo, las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar la obtención de tejido de un animal o humano para ser ensayado (6), la fijación o congelación de dicho tejido (7), el tratamiento de dicho tejido fijo o congelado para desenmascarar epítopos frente a SOX10 (8), la puesta
 50 en contacto de dicho tejido tratado con un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como los que se describen en el presente documento, en una cantidad y en condiciones tales que un anticuerpo o fragmento del mismo se une a una proteína SOX10 si la proteína está presente en dicho tejido (9); y posiblemente incluso la detección de la presencia de dichos anticuerpos unidos (10), tal como se representa esquemáticamente en la figura 62.

La figura 61 muestra un resumen esquemático de diversas realizaciones de la presente invención que incluyen un kit (5) que puede proporcionar un anticuerpo, fragmento del mismo, porción del mismo, en una composición o incluso en un cóctel, posiblemente incluso proporcionado a partir de un hibridoma, el anticuerpo (1) o similares pueden
 55 ponerse en contacto con una muestra biológica (2) para formar, como mínimo, un complejo anticuerpo-antígeno (3) que posteriormente puede detectarse con un detector (4).
 60

La presente invención puede proporcionar, en realizaciones, un kit de prueba de diagnóstico o incluso pronóstico que puede incluir un anticuerpo o fragmento del mismo (tal como los discutidos en el presente documento) con un elemento de detección de anticuerpos del anticuerpo o fragmento del mismo posiblemente cuando se une a un antígeno. Esto puede proporcionar un procedimiento para poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o fragmento del mismo e incluso detectar la unión de, o incluso la presencia del anticuerpo o fragmento
 65 del mismo unido a una proteína o con un antígeno en la muestra biológica, utilizando posiblemente un elemento de

detección de anticuerpos. Las realizaciones pueden proporcionar un procedimiento de inmunoensayo para detectar una proteína SOX10 en un mamífero o ser humano, posiblemente mediante la obtención de un tejido de un animal o un ser humano a ensayar, poniendo en contacto el tejido con un anticuerpo o fragmento del mismo según las diversas realizaciones presentadas en el presente documento, posiblemente en una cantidad y en condiciones tales que el anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse a una proteína SOX10 si la proteína está presente en el tejido; e incluso detectar la presencia de anticuerpos unidos. Una muestra biológica puede incluir, sin que constituyan limitación, sangre, orina, tejido urotelial, tejido de células de transición, tejido de vejiga, tejido normal, tejido neoplásico, tejido de riñón, tejido ovárico, tejido tiroideo, tejido endometrial, tejido renal, tejido amigdalario, tejido pancreático, tejido de colon, tejido de ganglios linfáticos, tejido pancreático neoplásico, tejido estomacal, tejido prostático, tejido pulmonar, tejido mamario o similares, posiblemente dependiendo del anticuerpo o incluso el cóctel que se esté utilizando.

Se hace notar que la utilización de términos tales como SOX10, anticuerpo para SOX10, BC34 o similares puede relacionarse con anticuerpos anti-SOX10 o similares, según corresponda, como entendería un experto en la materia. Se hace notar que los componentes de un cóctel de anticuerpos se pueden denotar con un "+". (por ejemplo, "MART-1 + tirosinasa" identifica un cóctel de anticuerpos MART-1 y tirosinasa.) Además, en algunos casos, un reactivo de anticuerpo puede incluir más de un clon de anticuerpo para la misma diana (por ejemplo, MART-1 puede incluir dos anticuerpos monoclonales de ratón anti-MART-1, el clon M2-7C10 y el clon M2-9E3).

Se ha adjuntado a la presente solicitud el artículo "A Newly Developed Mouse Monoclonal SOX10 Antibody is a Highly Sensitive and Specific Marker for Malignant Melanoma, Including Spindle Cell and 10 Desmoplastic Melanomas " de Tacha, David; Qi, Weiman; Bremer, Ryan; Yu Charlie Hoang, Laura; Ra, Seong; y Robbins, Bruce. Biocare Medical, Concord, California, Grupo Médico de Patólogos de San Diego, San Diego, California.

I. DOCUMENTOS DE PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

Número de patente	Tipo de código	Fecha de emisión	Nombre del propietario o solicitante del citado documento
7468425	B2	23-12-2008	Sidransky, et al.
6946256	B1	20-09-2005	McKeon, et al.

II. DOCUMENTOS DE PATENTE EXTRANJERAS

Número de patente extranjera	Código de país	Tipo de código	Fecha de emisión	Nombre
2012154983	WO	A2	15-11-2012	Biocare Medical LLC

III. DOCUMENTOS DE BIBLIOGRAFÍA NO DE PATENTES

"SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues." Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2012; Avance de publicación online
"The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor." Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, et. al. Hum Genet. 1998;103: 115-123
"The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia." Mollaaghbabab R, Pavan WJ. Oncogene. 2003; 22: 3024-3034
"Expression of the SOX10 gene during human development." Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, et. al. FEBS Lett. 1998; 432: 168-172
"Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas." Bannykh SI, Stolt CC, Kim J, Perry A, Wegner M. J Neurooncol. enero de 2006; 76(2): 115-27
"The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development." Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, et. al. Genes Dev. 2001; 15: 66-78
"Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas." Bannykh SI, Stolt CC, Kim J, Perry A, Wegner M. J Neurooncol. enero de 2006; 76(2): 115-27
"Incidence and survival of desmoplastic melanoma in the United States, 1992-2007." Feng Z, Wu X, Chen V, et. al. J Cutan Pathol. 2011; 38: 616-624
Desmoplastic malignant melanoma." Conley J, Lattes R, Orr W. Cancer. 1971;28:914- 916
"Desmoplasia and neurotropism. Prognostic variables in patients with stage I melanoma." Baer SC, Schultz D, Synnestvedt M, et. al. Cancer. 1995;76:2242-2247
"Subclassification of desmoplastic melanoma: pure and mixed variants have significantly different capacities for lymph node metastasis." George E, McClain SE, Slingluff CL, et. al. J Cutan Pathol. 2009; 36:425-432
"SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics." Palla B, Su A, Binder S, Dry S. Am J Dermatopathol. julio de 2013; 35(5):576-81
"Sox10 is expressed in primary melanocytic neoplasms of various histologies, but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses." Shin J, Vincent JG, Cuda JD, et. al. J Am Acad Dermatol. octubre de 2012; 67(4): 717-26
"MCW melanoma cocktail for the evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma." Shidham VB, Chang CC. Expert Rev Mol Diagn. mayo de 2005; 5(3):281-90

III. DOCUMENTOS DE BIBLIOGRAFÍA NO DE PATENTES

"Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers." Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, et al. Am J Surg Pathol. febrero de 2001; 25(2):205-11
"Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker." Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Am J Surg Pathol. 2008; 32: 1291-1298
"Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas." Cimino-Mathews A, Subhawong AP, Elwood H, et. al. Hum Pathol. junio de 2013; 44(6): 959-65
"Sox10-positive sustentacular cells in neuroendocrine carcinoma of the lung." Tsuta K, Raso MG, Kalhor N, et. al. Histopathology. junio de 2011; 58(2):276-85
"SOX10 and S 100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms." Karamchandani JR, Nielsen TO, van de Rijn M, West RB. Appl Immunohistochem Mol Morphol. octubre de 2012; 20(5): 445- 50
Solicitud provisional de Estados Unidos número 61/706, 312 presentada el 27 de septiembre de 2012; titulada Systems and Methods for Anti-Uroplakin II Antibodies
Solicitud provisional de Estados Unidos número 13/830,473 presentada el 14 de marzo de 2013; titulada Systems and Methods for Anti-Uroplakin III Antibodies
Solicitud internacional PCT/US2013/062043m presentada 26/09/2013; titulada Anti-Uroplakin II Antibodies Systems and Methods
Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. Am J Surg Pathol. 2008; 32: 1291-1298
Karamchandani JR, et. al. SOX10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. Appl Immunohistochem Mol Morphol. octubre de 2012; 20(5):445-50
Buonaccorsi JN, Prieto VG, Torres-Cabala C, Suster S, Plaza JA. Diagnostic Utility and Comparative Immunohistochemical Analysis of MITF-1 and SOX10 to Distinguish Melanoma In Situ and Actinic Keratosis: A Clinicopathological and Immunohistochemical Study of 70 Cases. Am J Dermatopathol. 18 de junio de 2013. Avance de publicación online
Agnarsdóttir M, Sooman L, Bolander A, et. al. SOX10 expression in superficial spreading and nodular malignant melanomas. Melanoma Res. diciembre de 2010; 20(6):468-78
Seong I, Min HJ, Lee JH, et. al. Sox10 controls migration of B16F10 melanoma cells through multiple regulatory target genes. PLoS One. 2012;7(2)
Ramos-Herberth FI, Karamchandani J, Kim J, Dadras SS. SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. J Cutan Pathol. septiembre de 2010;37(9):944-52
Ivanov SV, Panaccione A, Nonaka D, et. al. Diagnostic SOX10 gene signatures in salivary adenoid cystic and breast basal-like carcinomas. Br J Cancer. 23 de julio de 2013; 109(2): 444-51
Solicitud provisional de Estados Unidos número 61/886,448 presentada el 3 de octubre de 2013; titulada Systems and Methods for Anti-SOX10 Antibodies
Solicitud provisional de Estados Unidos número 61/941,907 presentada el 19 de febrero de 2014; titulada Systems and Methods for Anti-SOX10 Antibodies
Shidham, et al., MCW melanoma cocktail for the evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma; expert Rev Mol Diagn. mayo de 2005; 5(3): 281-90
Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, et al. Am J Surg Pathol. febrero de 2001; 25(2):205-11; Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers

(A Newly Developed Mouse Monoclonal SOX10 Antibody is a Highly Sensitive and Specific Marker for Malignant Melanoma, Including Spindle Cell and Desmoplastic Melanomas) Tacha, David,¹ Qi Weiman,¹ Bremer, Ryan,¹ Yu Charlie¹, Chu Joseph¹, Hoang, Laura,¹ Ra, Seong,² and Robbins, Bruce.² ¹Biocare Medical, Concord, California, ²San Diego Pathologists Medical Group, San Diego, California

Contexto-Estudios inmunohistoquímicos recientes han demostrado la expresión de SOX10 en melanomas malignos, tumores malignos de la vaina del nervio periférico, un subconjunto de carcinomas de mama y en gliomas. SOX10 ha demostrado una importante utilidad clínica en su capacidad para detectar melanomas desmoplásicos y de células fusiformes. Hasta la fecha, la mayoría de las publicaciones han utilizado un anticuerpo para SOX10 policlonal de cabra de utilización exclusiva en investigación (RUO, de *research use only*) para tinción inmunohistoquímica.

Objetivo y diseño. En el presente documento se describe el desarrollo de un nuevo anticuerpo [BC34] monoclonal para SOX10 de ratón y se evalúa su perfil de tinción inmunohistoquímica en una amplia gama de tejidos normales y neoplásicos con énfasis en el melanoma.

Resultados.-En tejidos normales, SOX10 se expresó en melanocitos de la piel y células ecrinas, células epiteliales mioepiteliales y lobulares de mama, células mioepiteliales de glándulas salivales, células de Schwann de nervio periférico y células gliales del sistema nervioso central. SOX10 se expresó en 238/257 (92,6 %) de melanomas, incluidos 50/51 (98 %) de melanomas de células fusiformes y desmoplásicas. SOX10 se expresó en el 100 % de los nevos (20/20) y los schwannomas (28/28). En otras neoplasias, SOX10 se expresó en 18/109 (16,5 %) de carcinomas ductales invasivos de mama. Todos los demás carcinomas fueron negativos para SOX10. SOX10 se

identificó en 25/52 de las neoplasias del sistema nervioso central principalmente en los astrocitomas 22/41 (53,7 %) y en 4/99 (4,0 %) de diversos sarcomas examinados.

Conclusión.-En resumen, se ha demostrado que el anticuerpo [BC34] SOX10 monoclonal de ratón recientemente desarrollado es altamente sensible y específico para el melanoma maligno, que incluye los melanomas de células fusiformes y desmoplásicas.

La proteína del gen 10 de HMg-Box relacionada con Sry (SOX10) es un factor de transcripción humano importante para la cresta neural, el sistema nervioso periférico y el desarrollo de células melanocíticas.¹⁻⁴ Se ha demostrado que la proteína nuclear SOX10 se expresa ampliamente en los tejidos humanos normales, incluidos los melanocitos, las células de Schwann, las células mioepiteliales de las glándulas mamarias y salivales y las células oligodendrogiales.^{1-3, 5, 6} También se expresa en tumores malignos, tales como el melanoma, los tumores malignos de la vaina del nervio periférico y un subconjunto de carcinomas de mama. También se ha demostrado que la mayoría de los oligodendrogliomas, pero también un gran porcentaje de astrocitomas y glioblastomas expresan SOX10.^{3, 5} SOX10 también está presente en tumores benignos, tales como nevos melanocíticos, schwannomas y neurofibromas.^{1-3, 5, 7}

SOX10 se expresa fuertemente en melanomas desmoplásicos (DM, de *desmoplastic melanoma*) y melanomas de células fusiformes (SCM, de *spindle cell melanoma*).¹ DM y SCM son positivos generalmente para la proteína S-100, pero a menudo son negativos o solo focalmente positivos con otros marcadores de melanoma. El DM es propenso a diagnósticos erróneos no solo clínicamente, sino también histológicamente.⁹

Se ha realizado un gran esfuerzo para encontrar un marcador adecuado para diferenciar las células fusiformes y los melanomas desmoplásicos de sus imitaciones patológicas. Entre los marcadores de melanocitos, SOX10 ha demostrado ser el más prometedor. Hasta la fecha, la mayoría de las publicaciones han utilizado un procedimiento de inmunohistoquímica utilizando un SOX10 policlonal de cabra de utilización exclusiva para investigación (RUO).^{1, 7, 11-18} En el presente documento se describe el desarrollo de un nuevo hibridoma SOX10 monoclonal de ratón [BC34] y se evalúa su sensibilidad y especificidad en tejidos normales y neoplásicos con un énfasis en el melanoma y sus subtipos

Materiales y procedimientos

Generación de hibridoma SOX10

Inmunización del huésped: se inmunizaron ratones BALB/c hembra (de 6 a, aproximadamente, 8 semanas de edad) por vía intraperitoneal con 100 µg de proteína SOX10 humana recombinante por ratón en adyuvante completo de Freund. Tres semanas más tarde, los ratones fueron reforzados con otros 100 µg de SOX10 humana por ratón en adyuvante incompleto de Freund 4 veces más en intervalos de 3 semanas. Se desangraron los ratones desde las colas y se recogieron los sueros y se almacenaron a -20 °C.

Hibridoma: se generaron hibridomas que producían anticuerpos contra SOX10 mediante técnicas estándar a partir de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con SOX10. Los esplenocitos de ratones inmunizados con SOX10 se fusionaron con células de mieloma P3-X63-Ag 8.653. Los sobrenadantes de hibridoma se seleccionaron mediante ensayo de adsorción (ELISA) para determinar la reactividad de anticuerpos frente a SOX10. Posteriormente, se seleccionaron los clones de hibridoma en función de su especificidad y especificidad en secciones de tejidos específicos fijados con formalina e incluidos en parafina.

ELISA: Se midieron las respuestas inmunitarias antisuero del huésped a SOX10 mediante ELISA y se midieron en un lector de placas de microtitulación. Los anticuerpos [BC34] SOX10 monoclonales se isotiparon utilizando un kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón (Invitrogen, Carlsbad, California). El isotipo del clon BC34 se identificó como un IgG1 de ratón. Las células de hibridoma seleccionadas del clon BC34 se cultivaron en medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10 %. Se inyectaron células de hibridoma en ratones BALB/c para producir ascitis de anticuerpos. Se purificó ascitis del anticuerpo adicionalmente en una columna de afinidad de proteína A. La concentración de IgG se midió por espectrofotometría.

Reactividad cruzada de anticuerpo ensayada mediante transferencia Western: el anticuerpo SOX10 monoclonal purificado se caracterizó por transferencia Western. Los lisados celulares transfectados con SOX10 humano de longitud completa se separaron utilizando electroforesis en gel. Las transferencias de proteínas se visualizaron incubando el anticuerpo SOX10 durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubación con inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con peroxidasa de cabra (figura 123).

Micromatriz de tejidos (TMA, de Tissue MicroArray): se construyeron TMA internamente y/o se compraron en US Biomax (Rockville, Maryland). Se evaluó [BC34] SOX10 en diversos tipos de melanomas malignos, incluyendo melanoma cutáneo, melanoma metastásico, melanoma desmoplásico y de células fusiformes y variantes de melanoma (n = 257), en Schwannoma (n = 28) y en nevos (compuesto, intradérmico y unión) (n = 20). Para evaluar

la especificidad de SOX10, se evaluó una micromatriz de tejido normal (TMA) (n = 34), secciones de tejidos completos y TMA en diversos tejidos neoplásicos (n = 749).

Inmunohistoquímica: se desparafinizaron tejidos enteros incluidos en parafina fijados con formalina y TMA tisulares y se hidrataron en agua. Los portaobjetos se expusieron posteriormente a 5 minutos de peróxido de hidrógeno y se lavaron en agua. Los TMA se sumergieron en una solución de recuperación de antígeno (tampón de citrato modificado, pH 6,0) y se colocaron en una olla a presión (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Concord, CA) a 125 °C durante 30 segundos. Los portaobjetos de tejido se enfriaron a 80 °C y se lavaron en agua. Se diluyó y optimizó [BC34] SOX10 a 1:100 en un diluyente tris modificado, pH 6,0, y los tejidos se incubaron durante 30 minutos y posteriormente se enjuagaron en TBS. Se aplicó una detección de peroxidasa de rábano picante anti-ratón de cabra (HRP) o de polímero de fosfatasa alcalina (MACH 2, Biocare Medical) a secciones de tejido durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se enjuagaron posteriormente en TBS y las secciones se incubaron durante 5 minutos en 3,3'-diaminobencidina (DAB) o 10 minutos en cromógeno Fast Red.

Procedimiento de calificación: cada caso se consideró "positivo" si se observaba más de ≥ 1 % de las células que se teñían. Por el contrario, menos del 1 % de células tumorales teñidas determinó un caso "negativo". Solo la tinción nuclear se consideró positiva.

Resultados

La tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal SOX10 produjo una fuerte tinción nuclear en tejidos positivos, esencialmente sin tinción de fondo. En tejidos normales (n = 34), SOX10 se expresó en melanocitos de la piel, una porción de células epiteliales y mioepiteliales glandulares ecrinas, células mioepiteliales de mama, así como un subconjunto de células epiteliales lobulares, células mioepiteliales de glándulas salivales, células periféricas, células de Schwann y células gliales cerebrales (figuras 124 A-F). SOX10 también tiñó pequeñas cantidades de células del estroma en la muscular propia y la lámina propia en todo el tracto digestivo y escasas células del estroma en otros tejidos diferentes (la población total de células teñidas fue <1 %); sin embargo, todos los demás componentes celulares en estos tejidos no mostraron expresión y, por lo tanto, estos tejidos se calificaron como negativos (tabla 7).

SOX10 se expresó en 238/257 (92,6 %) melanomas (figura 125 A-D) (tabla 8). Particularmente, 50/51 (98 %) SCM y DM fueron positivos para SOX10 (figura 126 A-C) y SOX10 también tiñó el melanoma sarcomatoide (figura 126 D). En casos benignos, SOX10 fue positivo en los schwannomas (28/28) examinados (tabla 10, figura 127 A), y en nevos (20/20) (tabla 8 figura 127 B).

En otras neoplasias (tabla 9), SOX10 se expresó en 18/109 (16,5 %) carcinomas ductales invasivos de mama (figura 128 A). SOX10 tiñó células mioepiteliales que rodean el carcinoma ductal de mama in situ (figura 128 B). Todos los demás carcinomas estudiados fueron negativos para SOX10. Entre los sarcomas, se observó tinción con SOX10 en 1/22 (4,5 %) de leiomiomas, en 2/22 (9,1 %) de rhabdomiomas y en 1/13 (7,7 %) de histiocitomas fibrosos malignos, con todos los demás sarcomas negativos. La tinción con SOX10 se identificó en 25/52 neoplasias del sistema nervioso central principalmente en astrocitomas 22/41 (53,7 %) (figura 128 C, tabla 9); y en casos limitados se expresó en glioblastoma y ependimoma (tabla 9).

La evaluación de los tumores neuroendocrinos mostró que SOX10 era negativo en todos los tumores carcinoides del tracto digestivo, incluidos el colon, el estómago, el intestino delgado y el apéndice. En los tumores carcinoides pulmonares e intestinales, algunas células sustentaculares fueron positivas para SOX10, pero las células neoplásicas aparecieron negativas (figura 128 D).

Discusión

Estudios anteriores han demostrado que SOX10 es un marcador nuclear altamente sensible y específico para el melanoma tanto en lesiones primarias como metastásicas.^{1, 11-15} En el presente estudio, 106/110 (96,4 %) de melanomas cutáneos primarios se teñieron con SOX10. Esto se compara bien con el estudio de Nonaka *et al.*, ya que se encontró expresión nuclear de SOX10 en 76 de 78 melanomas (97 %).⁷ En un estudio realizado por Shin J *et al.*, SOX10 se expresó en el 100 % de las DM y fue negativo en todas las imitaciones histológicas, tales como el carcinoma de células fusiformes, el fibroxantoma atípico (AFX) y los sarcomas.¹³ Karamchandani JR *et al.*, también mostró resultados comparables ya que solo 1/78 (1,3 %) de los casos de diversos sarcomas expresaron SOX10.¹⁶ En el presente estudio, SOX10 se expresó en 50/51 (98 %) de melanomas desmoplásicos y de células fusiformes, y se expresó en 4/99 (4,0 %) en diversos tipos de sarcomas (tabla 8). Nonaka *et al.*, mostraron que SOX10 se expresaba en 38/77 (49 %) de los tumores malignos de la vaina del nervio periférico (MPNST).⁷ El presente estudio fue limitado, incluyendo solo 2 MPNST que fueron negativos.

DM y SCM pueden presentar desafíos de diagnóstico para el patólogo debido a imitaciones histológicas y limitaciones con tinción inmunohistoquímica (figura 126 A-D). Aunque S100 generalmente tiñe DM, otros marcadores de melanoma, tales como HMB45 y Melan-A han demostrado ser negativos en la mayoría de los casos.¹⁴ Otras imitaciones histológicas de DM incluyen fibroblastos o histiocitos fusiformes dentro de cicatrices de escisión previas.

Ramos-Herberth, FI *et al.*, demostraron que era menos probable que los fibroblastos e histiocitos de fondo dentro de las cicatrices expresaran SOX10 que S100 y, por lo tanto, SOX10 era superior a S100 en este tipo de casos.¹⁵

A pesar de la falta de especificidad de S100, los patólogos todavía utilizan S100 en el diagnóstico de tumores derivados de la cresta neural; sin embargo, se ha demostrado que SOX10 es altamente específico y rara vez se expresa en tumores no schwannianos y no melanocíticos en el diagnóstico diferencial de melanoma y tumores de la vaina del nervio periférico. Un enfoque recomendado incluiría tanto S100 como SOX10 en el diagnóstico de melanoma o tumores periféricos de la vaina nerviosa.¹⁶ En el presente estudio, SOX10 fue negativo en la gran mayoría de los tumores no melanocíticos (tabla 9). Estos hallazgos muestran concordancia con otros estudios.^{1,7} SOX10 se ha demostrado en un subconjunto de carcinomas de mama, incluidos los carcinomas basales o triple negativos, y en los carcinomas metaplásicos. Este hallazgo apoya el concepto de que estas neoplasias pueden mostrar diferenciación mioepitelial.¹⁸ En el presente estudio, la tinción nuclear de SOX10 se expresó en células mioepiteliales de mama normales, así como en un subconjunto de células epiteliales lobulares de mama (figura 124D), y se expresó en el 16,5 % de los cánceres de mama infiltrantes. Se ha demostrado que SOX10 tiñe diversos tipos de tumores cerebrales.^{5,6} Bannykh SI *et al.*, demostraron que la mayoría de los oligodendrogliomas y una gran fracción de astrocitomas y glioblastomas expresaron SOX10;⁵ correlacionándose con los presentes resultados.

Los presentes hallazgos de la expresión de SOX10 en melanomas malignos (96,6 %) y en nevos y schwannomas benignos (100 %) demostraron una alta concordancia con otros estudios que utilizan el anticuerpo SOX10 policlonal de cabra bien publicado.^{1, 10-15, 19} La utilización de un anticuerpo primario de cabra RUO puede ser satisfactoria para fines de investigación; sin embargo, puede no ser aceptado de manera general en un entorno clínico. Los anticuerpos policlonales también son notorios por la variación de lote a lote y pueden producir una tinción de fondo no específica no deseada. En el estudio de Amr Mohamed *et al.*, se observó tinción de fondo no específica en microfotografías tanto en melanoma como en cáncer de mama.¹ En un estudio realizado por Zhong *et al.*, SOX10 fue fuertemente positivo en el citoplasma del tejido benigno de próstata y débilmente positivo en el citoplasma de los tejidos de cáncer de próstata.¹⁹ En el presente estudio, el nuevo anticuerpo monoclonal SOX10 produjo una tinción nuclear limpia, esencialmente sin tinción de fondo.

Conclusión

En resumen, se ha demostrado que el anticuerpo [BC34] SOX10 IHC monoclonal de ratón recientemente desarrollado es altamente sensible y específico para el melanoma maligno, incluidas las variantes de células desmoplásicas y fusiformes, y parece muy adecuado para su utilización clínica.

Referencias

1. Amr Mohamed, MD, Raul S. Gonzalez, MD, et al. SOX10 Expression in Malignant Melanoma, Carcinoma, and Normal Tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; Avance de publicación online
2. Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, et al. The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet.* 1998; 103: 115-123.
3. Mollaaghababa R, Pavan WJ. The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene.* 2003; 22: 3024-3034.
4. Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, et al. Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett.* 1998; 432: 168-172.
5. Bannykh SI, Stolt CC, Kim J, Perry A, Wegner M. Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas. *J Neurooncol.* enero de 2006; 76(2): 115-127
6. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 2001; 15: 66-78.
7. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocyte marker. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32: 1291-1298.
8. Feng Z, Wu X, Chen V, et al. Incidence and survival of desmoplastic melanoma in the United States, 1992-2007. *J Cutan Pathol* 2011; 38:616-624.
9. Conley J, Lattes R, Orr W. Desmoplastic malignant melanoma. *Cancer* 1971; 28: 914-916.
10. Busam KJ. Desmoplastic melanoma. *Clin Lab Med.* junio de 2011; 31(2): 321-330.
11. George E, McClain SE, Slingluff CL, et al. Subclassification of desmoplastic melanoma: pure and mixed variants have significantly different capacities for lymph node metastasis. *J Cutan Pathol* 2009; 36: 425-432.
12. Palla B, Su A, Binder S, Dry S. SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol.* julio de 2013; 35(5): 576-581.
13. Shin J, Vincent JG, Cuda JD, et al. Sox10 is expressed in primary melanocyte neoplasms of various histologies, but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses. *J Am Acad Dermatol.* octubre de 2012; 67(4): 717-726.
14. Palla B, Su A, Binder S, Dry S. SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol.* julio de 2013; 35(5): 576-581.
15. Ramos-Herberth FI, Karamchandani J, Kim J, et al. SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. *J Cutan Pathol.* 2010; 37: 944-952.

16. Karamchandani JR, et al. SOX10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. Appl Immunohistochem Mol Morphol. octubre de 2012; 20(5):445-450.
17. Tsuta K, Raso MG, Kalhor N, et al. Sox10-positive sustentacular cells in neuroendocrine carcinoma of the lung. Histopathology. enero de 2011; 58(2): 276-285.
18. Cimino-Mathews A, Subhawong AP, Elwood H, et al. Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas. Hum Pathol. junio de 2013; 44(6): 959-965.
19. Zhong WD, Qin GQ, Dai QS, et al. SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. BMC Cancer. 15 de junio de 2012; 12:2 48.

Tabla 7: Tejidos normales (n = 34)

Órgano	Expresión de SOX10	Órgano	Expresión de SOX10
Cerebro	+ (Células gliales)	Estómago	- (Escasas células estomales en propia y mucosa muscular)
Cerebelo	+ (Células gliales)	Intestino delgado	- (Escasas células estomales en propia y mucosa muscular)
Suprarrenal	-	Colon	- (Escasa células estomales en propia y mucosa muscular)
Ovario	-	Hígado	-
Páncreas	-	Glándula salival	+ (Células mioepiteliales)
Tiroides	-	Riñón	-
Paratiroides	-	Próstata	-
Testículos	-	Útero	-
Hueso	-	Cuello uterino	-
Bazo	-	Músculo estriado	-
Amígdalas	-	Piel	+ (Melanocitos, células mioepiteliales ecrinas, subconjunto de células mioepiteliales ecrinas)
Timo	-	Nervio (periférico)	+ (Células de Schwann)
Médula ósea	-	Laringe	-
Pulmón	- (Células mioepiteliales bronquiales)	Vejiga	-
Corazón	-	Placenta	-
Esófago	-	Mesotelio	-
Pituitaria	-		
Mama	+ (Células mioepiteliales, subconjunto de células epiteliales lobulares)		

Tabla 8: lesiones melanocíticas (n = 257)

Melanoma	Casos	SOX10 (+)	% (+)
Melanoma (cutáneo)	119	115	96,6
Melanoma metastásico	87	73	83,9
Melanoma de células fusiformes	19	19	100
Melanoma desmoplásico	29	28	96,6
Células de características mixtas desmoplásicas/fusiformes	3	3	100
Nevus benigno (diversos)	20	20	100

Tabla 9: diversos tejidos neoplásicos (n = 665)

Neoplasia	N.º de casos	SOX10 +	% (+)
Carcinomas de pulmón			
Adenocarcinoma	77	0	0
Carcinoma bronquioloalveolar	4	0	0
Carcinoma de células escamosas	71	0	0
Carcinoma de células adenoescamosas	1	0	0
Carcinoma macrocítico	5	0	0
Mesotelioma maligno	13	0	0
Adenocarcinoma de colon	24	0	0
Carcinoma ductal invasivo de mama	109	18	16,5
Adenocarcinoma de próstata	13	0	0
Carcinoma urotelial	48	0	0

Neoplasia	N.º de casos	SOX10 +	% (+)
Carcinoma de células renales (células claras)	15	0	0
Hígado (carcinoma hepatocelular)	57	0	0
Adenocarcinoma de esófago/carcinoma de células escamosas	10	0	0
Seminoma testicular	17	0	0
Adenocarcinoma seroso/endometriode ovárico	12	0	0
Feocromocitoma suprarrenal	10	0	0
Carcinoma papilar de tiroides	4	0	0
Adenocarcinoma de páncreas	12	0	0
Tumor de células de islotes	2	0	0
Linfoma no Hodgkin (linfocitos B y linfocitos T)	8	0	0
Linfoma de Hodgkin	2	0	0
Tumor neuroendocrino de bajo grado (tumor carcinoide): (tracto digestivo y pulmón)	20	0	0
Adenocarcinoma de cuello uterino/carcinoma de células escamosas	11	0	0
Carcinomas de piel			
Carcinoma basocelular	20	0	0
Carcinoma de células escamosas	20	0	0
Neoplasias del SNC			
Astrocitoma	41	22	53,7
Glioblastoma	7	2	28,6
Ependimoma	2	1	50
Meduloblastoma	2	0	0
Abreviaturas: SNC (sistema nervioso central)			

Tabla 10: expresión de SOX10 en tumores de tejidos blandos (n = 127)

Tumores de tejidos blandos	N.º de casos	SOX10 (+)	% de (+)
Schwannoma (neurilemmoma)	28	28	100
Leiomioma	31	2	6,5
Rabdomiosarcoma	22	1	4,5
Fibrosarcoma	7	0	0
Dermatofibrosarcoma protuberans	9	0	0
Liposarcoma	14	0	0
Angiosarcoma	1	0	0
Neurofibrosarcoma	2	0	0
Histiocitoma fibroso maligno	13	1	7,7

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Biocare Medical, LLC
- <120> Sistemas y procedimientos de anticuerpos anti-SOX10
- 10 <130> Biocare-SOX10-PCT
- <150> 61/886,488
- <151> 03-10-2013
- 15 <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 366
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 25

ES 2 765 423 T3

```

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg      60
acttgttctt tctctggggtt ttcactgagt acttttctta taggagtagg ctggattcgt      120
cagccttcag ggaaggggtct ggagtggctg gcacacattt ggtggaatga taataagtac      180
tataatacag ccctgaagaa ccggctcaca atctccaagg atacctcaa caatcaggta      240
ttcctcaaga tcgccagtgt ggacactaca gatactgcca catactactg tgttcgaatg      300
gcagggatag gtgggacgga tgctatggac tactgggggtc aaggaacctc agtcaccgtc      360
tcctca                                          366

<210> 2
<211> 334
5 <212> ADN
   <213> Homo sapiens

<400> 2

gacattgtgc tcaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagagccacc      60
atctcctgca gagccagtga aattgttgaa tattatggca caaatttact gcagtggtag      120
caacagaaac caggtcagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatcaa cgtagaatct      180
ggggtcacctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat      240
cctgtggagg aggatgatat tgcaatatat ttctgtcagc aaagtaggaa ggttccgtgg      300
10 acgttcogtg gaggcaccaa gctggaaatc aaac                                          334

<210> 3
<211> 15
15 <212> PRT
   <213> Homo Sapiens

<400> 3

          Gln Gly Gly Thr Ala Ala Ile Gln Ala His Tyr Lys Ser Ala His
          1          5          10          15

20 <210> 4
   <211> 122
   <212> PRT
   <213> Homo Sapiens

25 <400> 4

```

ES 2 765 423 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
 20 25 30

Leu Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 50 55 60

Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Arg Met Ala Gly Ile Gly Gly Thr Asp Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 5
- <211> 111
- 5 <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 5

ES 2 765 423 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ile Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30

Gly Thr Asn Leu Leu Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 6
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

10 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe Leu Ile Gly
 1 5 10

<210> 7
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

20 Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys
 1 5

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 8

Val Arg Met Ala Gly Ile Gly Gly Thr Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 9

ES 2 765 423 T3

Glu Ile Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Asn Leu
1 5 10

5 <210> 10
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

10 Ala Ala Ser
1

15 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

20 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Preparación aislada de un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente a una proteína SOX10, en la que dicho anticuerpo monoclonal de ratón se une a un epítipo en el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 3; dicho anticuerpo monoclonal de ratón comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
2. Preparación aislada de un anticuerpo monoclonal de ratón, según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo monoclonal de ratón está producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) bajo la designación de depósito de patente de ATCC No. PTA-120969.
3. Procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal de ratón, según la reivindicación 2, que comprende las etapas de:
cultivar dicho hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de ratón capaz de reconocer específicamente a la SOX10; y permitir que dicho hibridoma produzca el anticuerpo monoclonal de ratón.
4. Preparación aislada de un anticuerpo monoclonal de ratón, según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo monoclonal de ratón comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:1.
5. Composición que comprende, como mínimo, dos anticuerpos, en la que, como mínimo, uno de dichos, como mínimo, dos anticuerpos, comprenden dicho anticuerpo monoclonal de ratón producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) bajo la designación de depósito de Patente ATCC No. PTA-120969, según la reivindicación 2, que se une específicamente a la SOX10.
6. Composición, según la reivindicación 5, en la que dicha composición comprende un cóctel de anticuerpos primarios.
7. Composición, según la reivindicación 5, en la que dicho, como mínimo, otro de dichos, como mínimo, dos anticuerpos, es de una especie diferente que dicho anticuerpo monoclonal de ratón.
8. Composición, según la reivindicación 7, en la que dicha especie diferente se selecciona entre un grupo que consiste en conejo, cabra, caballo, pollo, ser humano y cualquier combinación de los mismos.
9. Composición, según la reivindicación 5, en la que dicho, como mínimo, otro de dichos, como mínimo, dos anticuerpos, se une específicamente a una proteína seleccionada entre un grupo que consiste en tirosinasa, MART-1, S100 y cualquier combinación de las mismas.
10. Composición, según la reivindicación 5, y que comprende adicionalmente un marcador unido a dicho anticuerpo monoclonal de ratón producido por el hibridoma depositado con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) bajo la designación de depósito de Patente ATCC No. PTA-120969, según la reivindicación 2, que se une específicamente a la SOX10.
11. Composición, según la reivindicación 10, en la que dicho marcador se selecciona entre un grupo que consiste en un elemento radiactivo, partículas magnéticas, radioisótopo, colorante fluorescente, enzima, toxina, señal, tinción, enzimas de detección, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa, cromógenos, Fast Red, 3,3'-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido, y cualquier combinación de los mismos.
12. Procedimiento para detectar una proteína a la que se une un anticuerpo, según las reivindicaciones 1, 2 o 4 o una composición, según la reivindicación 5, en una muestra biológica, que comprende las etapas de poner en contacto una muestra biológica con el anticuerpo, según las reivindicaciones 1, 2 o 4 o la composición, según la reivindicación 5, y detectar la presencia del anticuerpo o la composición unido a la proteína en la muestra biológica.
13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que dicha detección comprende un procedimiento seleccionado entre un grupo que consiste en inmunohistoquímica (IHC), IHC de FFPE, IHC de secciones de tejido congelado, inmunocitoquímica y ELISA.
14. Composición, según la reivindicación 5, en la que dicho anticuerpo monoclonal de ratón y dicho, como mínimo, otro anticuerpo, se unen específicamente a proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en:
SOX10 y MART-1;
SOX10 y tirosinasa; y
SOX10 y MART-1 y tirosinasa.

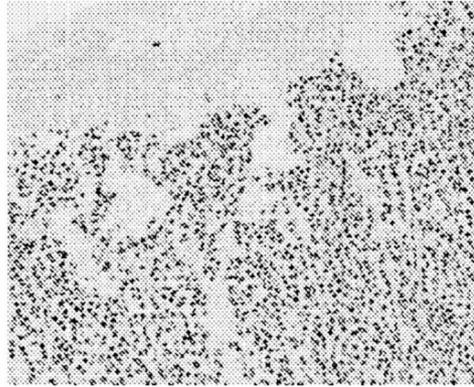


FIG. 1

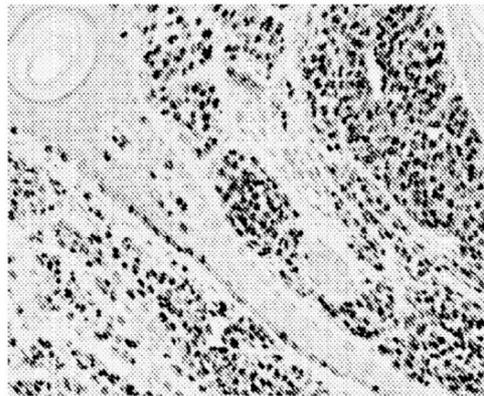


FIG. 2

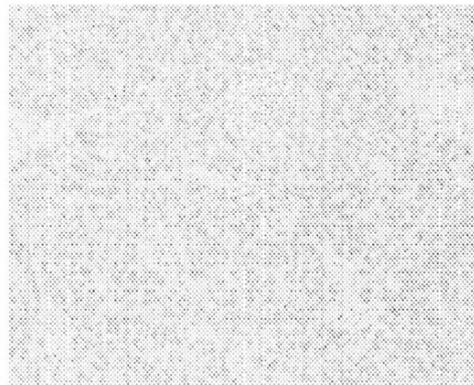


FIG. 3

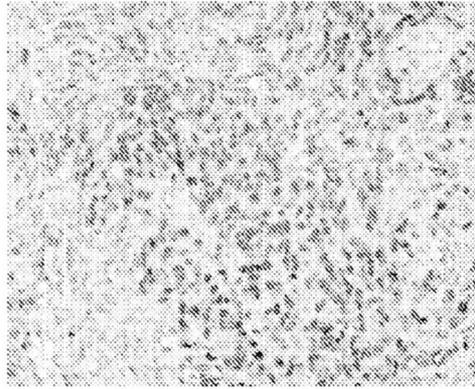


FIG. 4

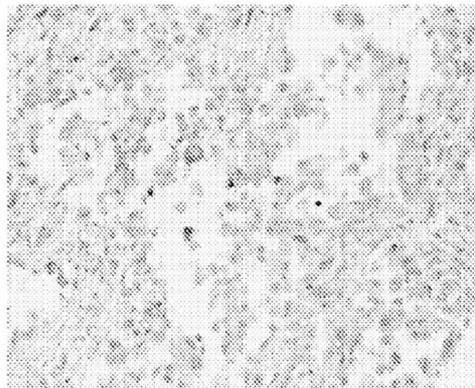


FIG. 5

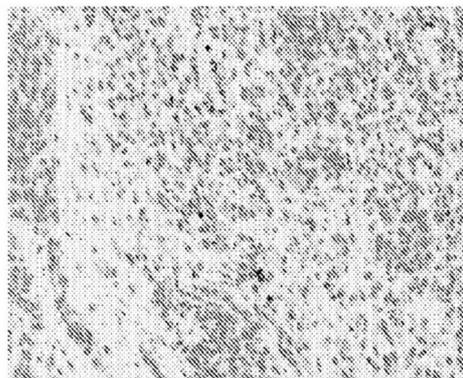


FIG. 6

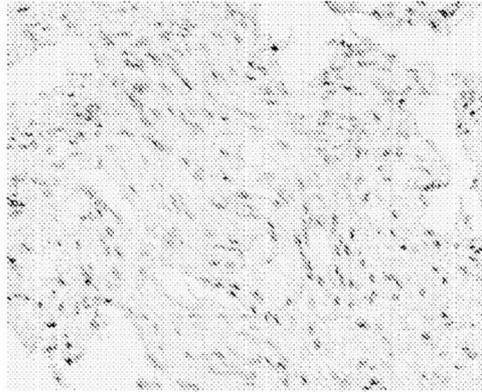


FIG. 7

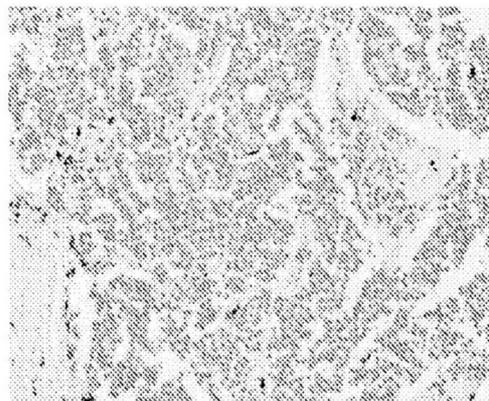


FIG. 8

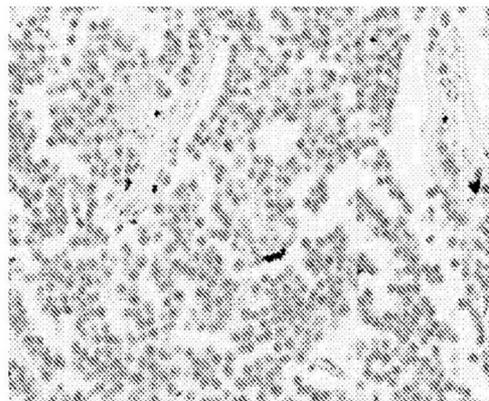


FIG. 9

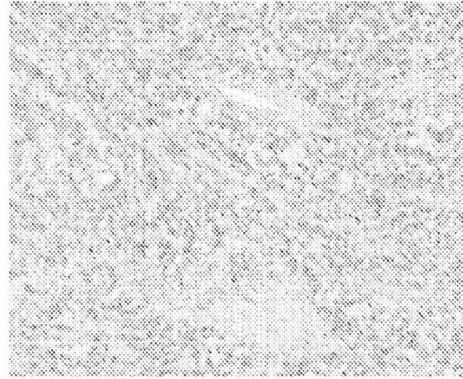


FIG. 10

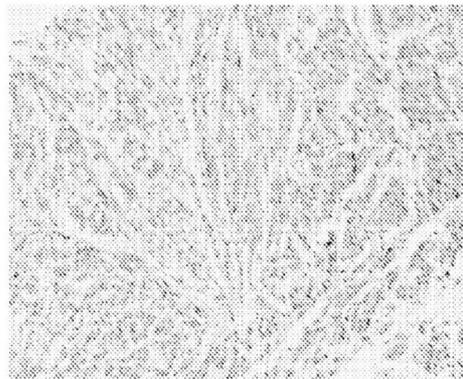


FIG. 11

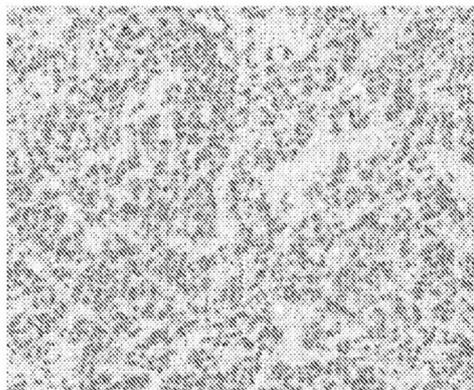


FIG. 12

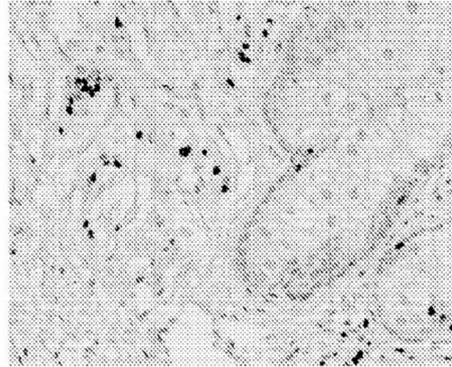


FIG. 13

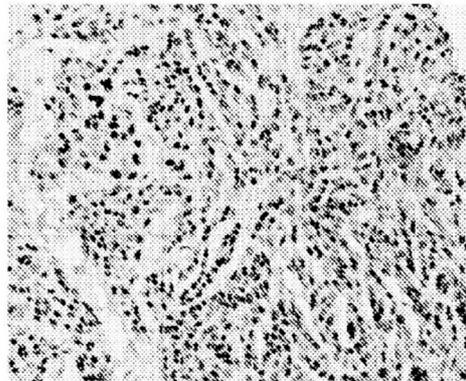


FIG. 14

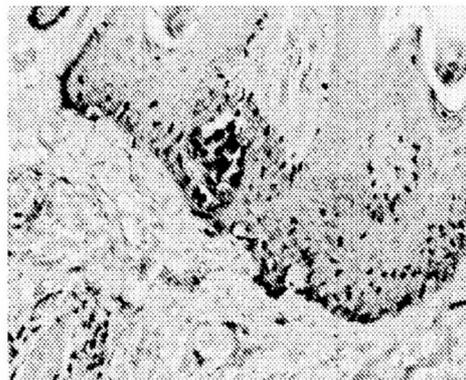


FIG. 15

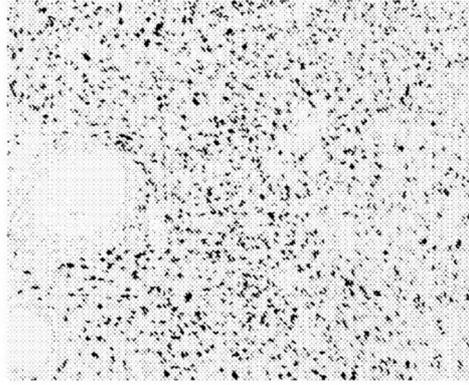


FIG. 16

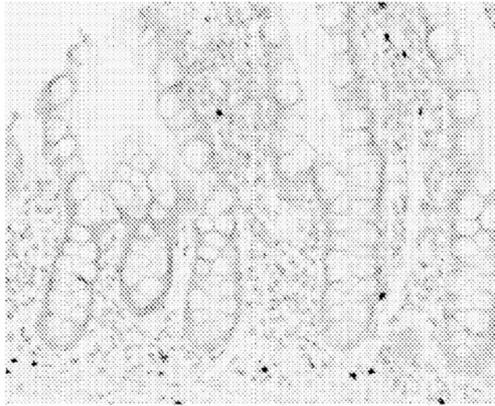


FIG. 17

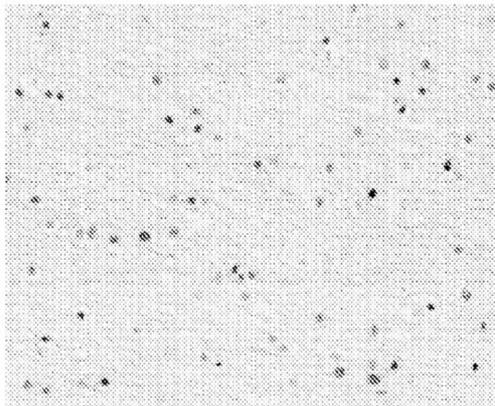


FIG. 18

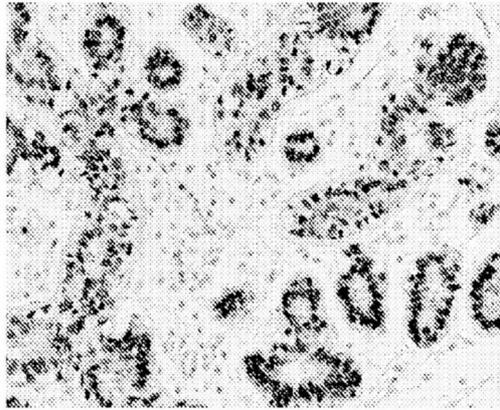


FIG. 19

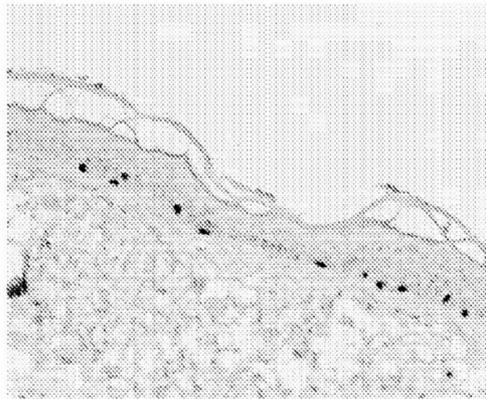


FIG. 20

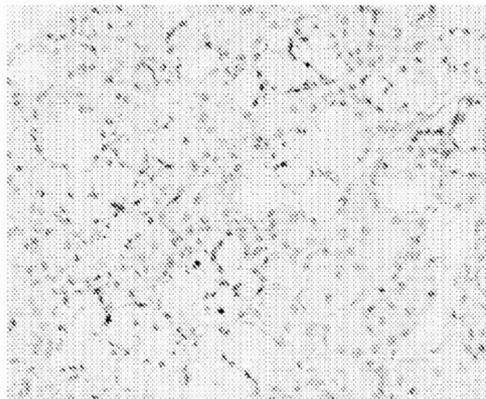


FIG. 21

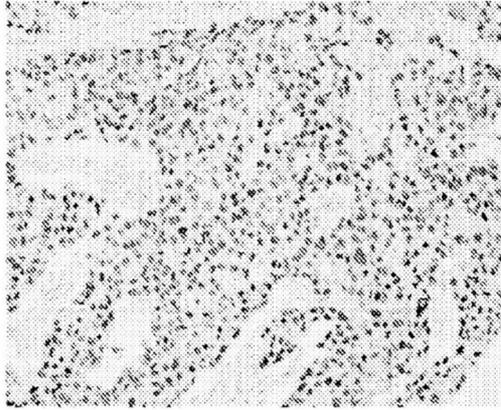


FIG. 22

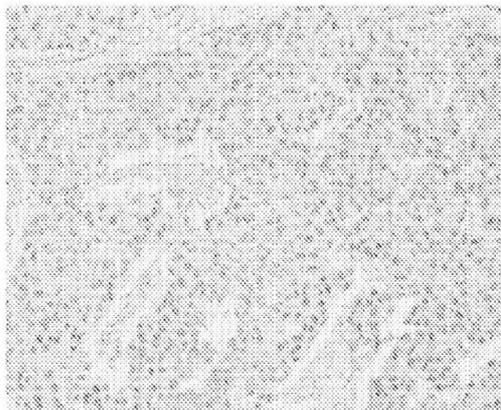


FIG. 23

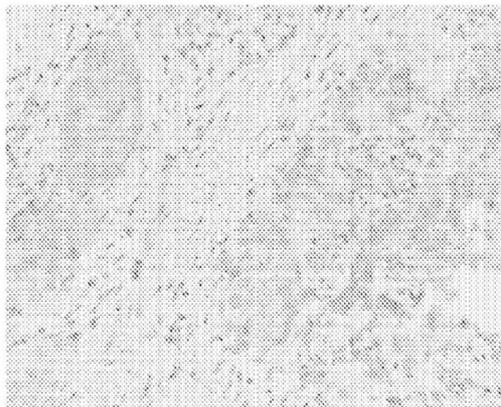


FIG. 24

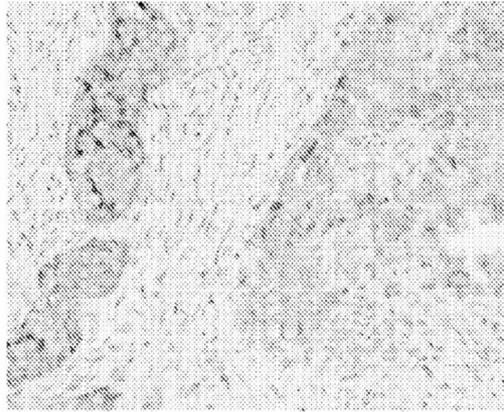


FIG. 25

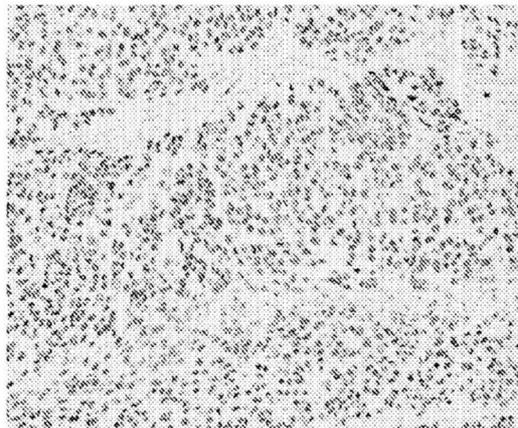


FIG. 26

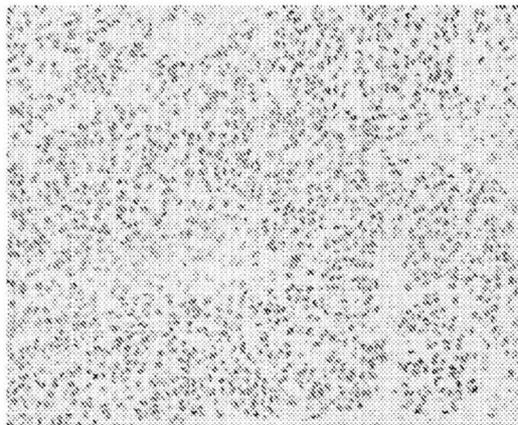


FIG. 27

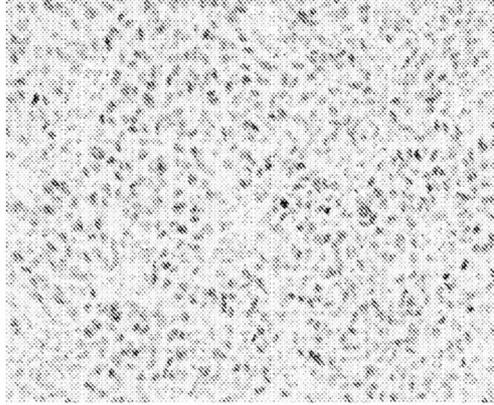


FIG. 28

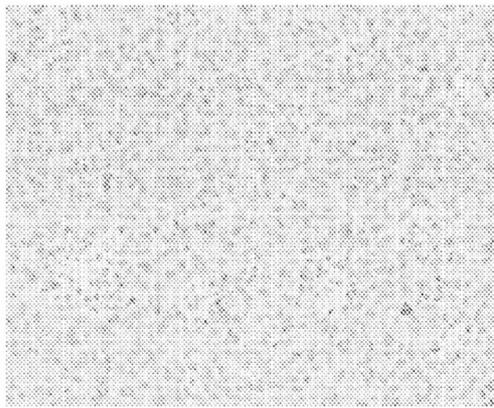


FIG. 29

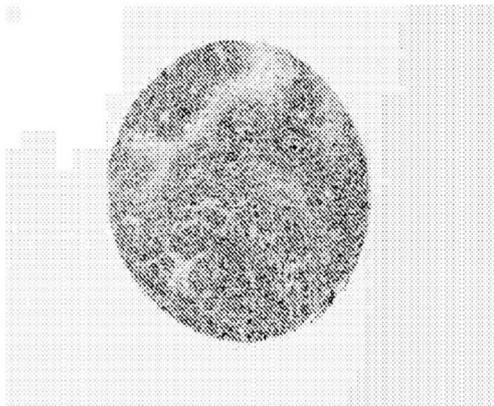


FIG. 30

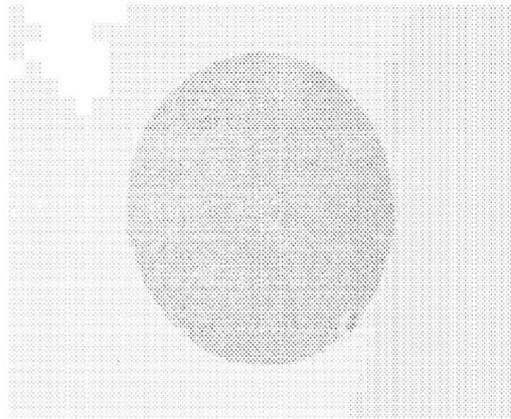


FIG. 31

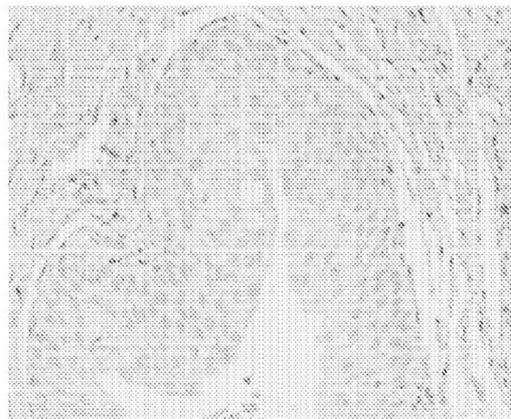


FIG. 32

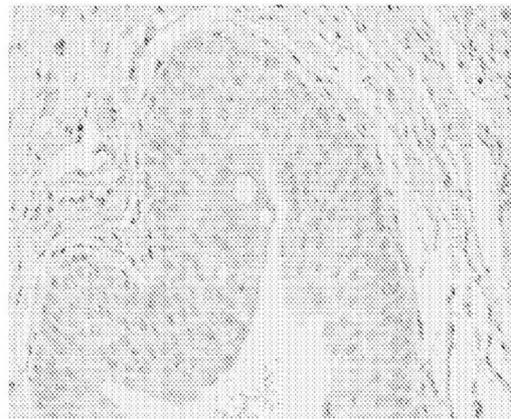


FIG. 33

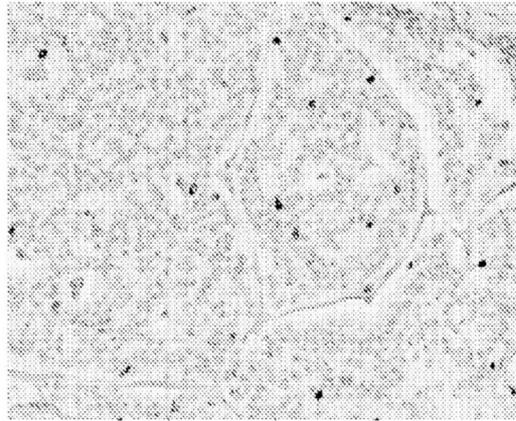


FIG. 34

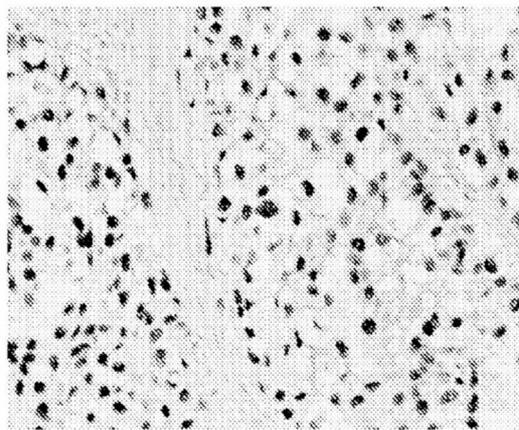


FIG. 35

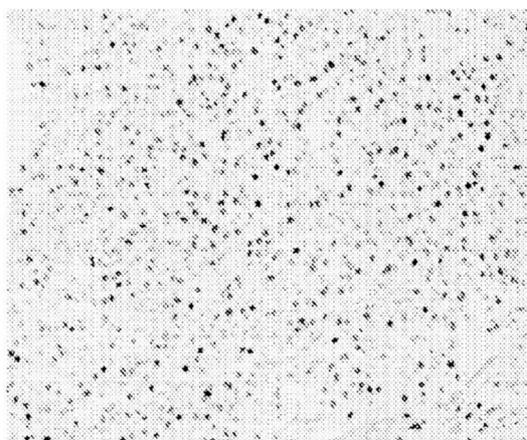


FIG. 36

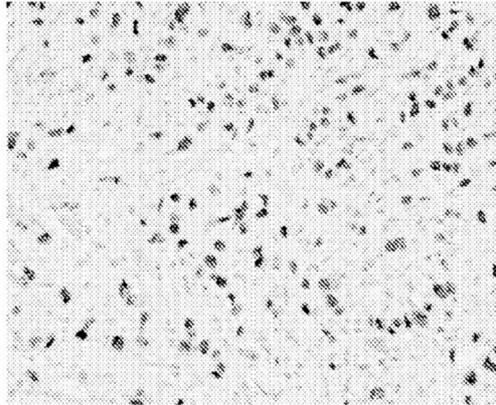


FIG. 37

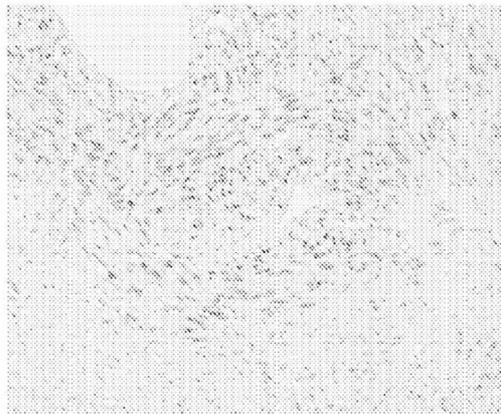


FIG. 38

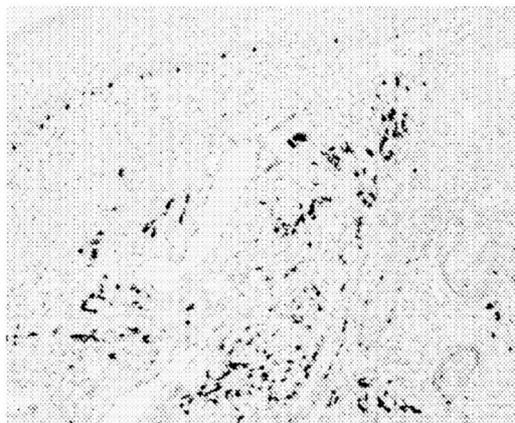


FIG. 39

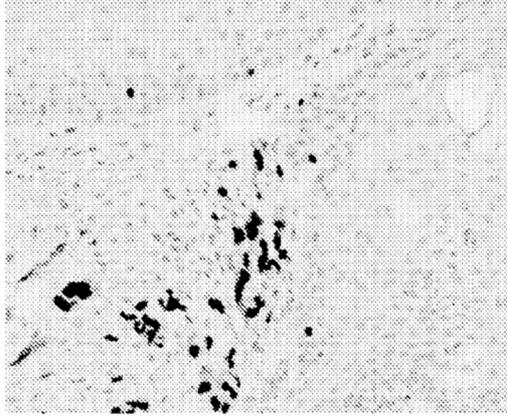


FIG. 40

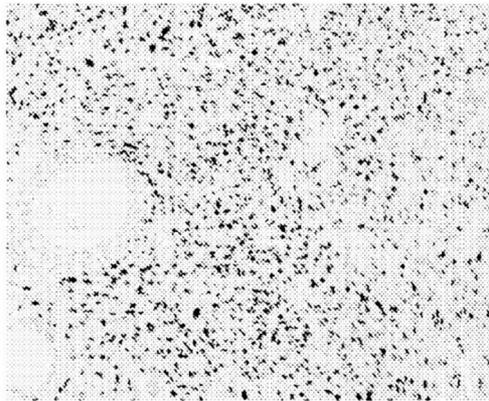


FIG. 41

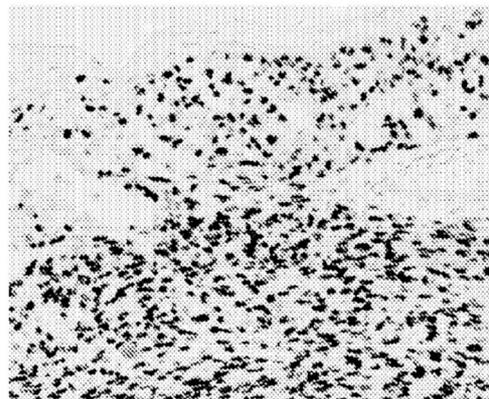


FIG. 42

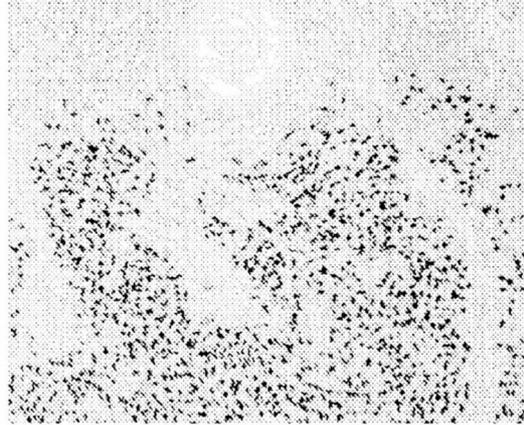


FIG. 43

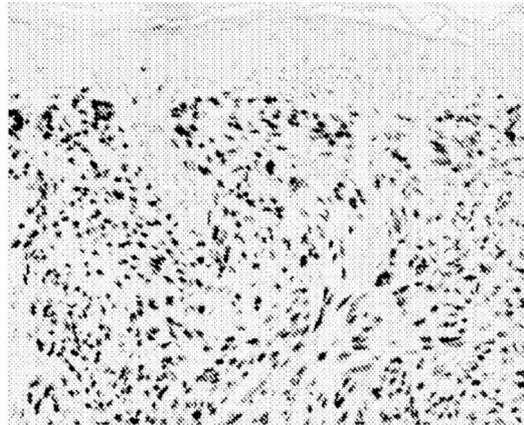


FIG. 44

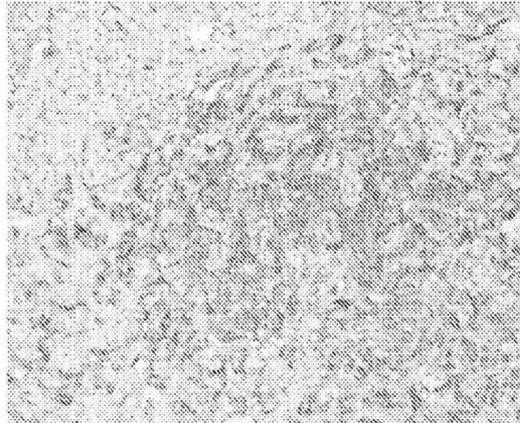


FIG. 45

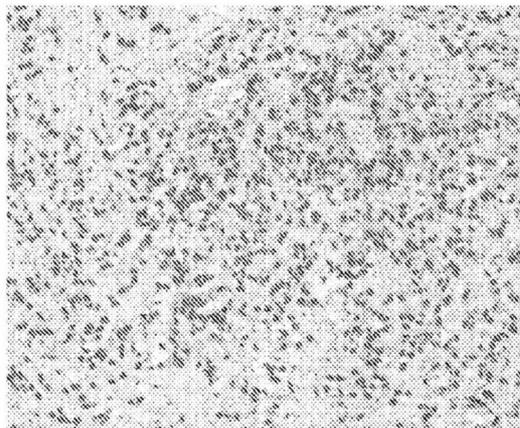


FIG. 46

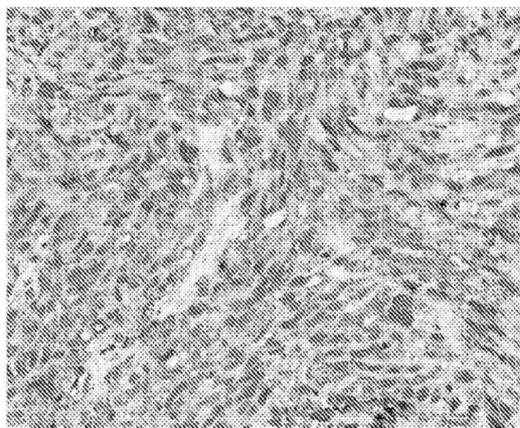


FIG. 47

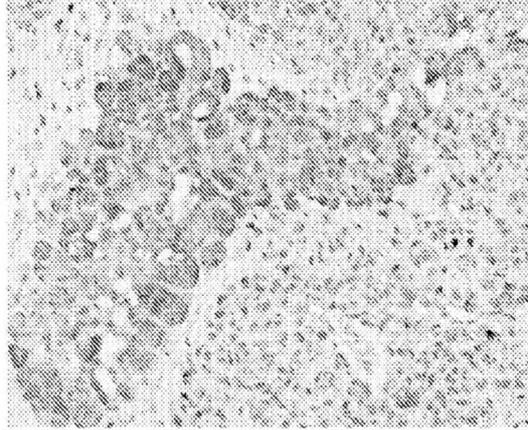


FIG. 48

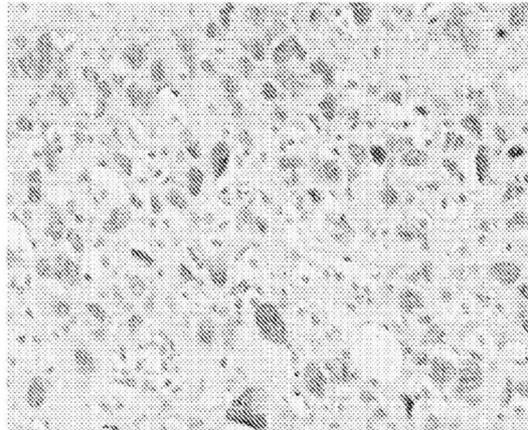


FIG. 49

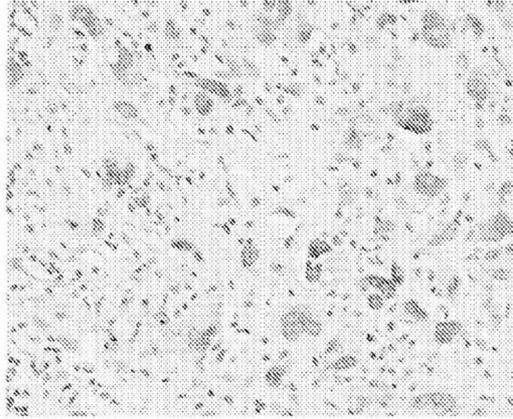


FIG. 50

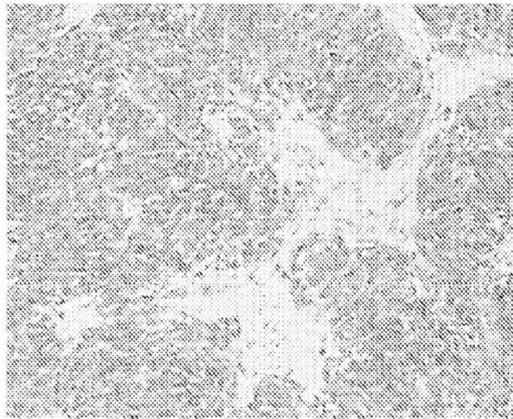


FIG. 51

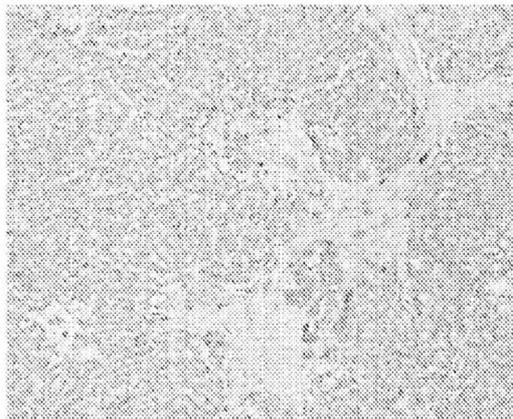


FIG. 52

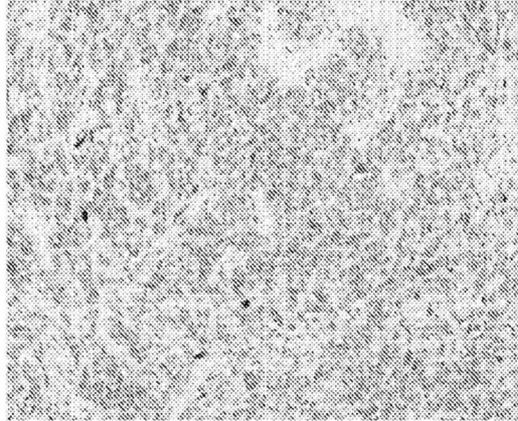


FIG. 53

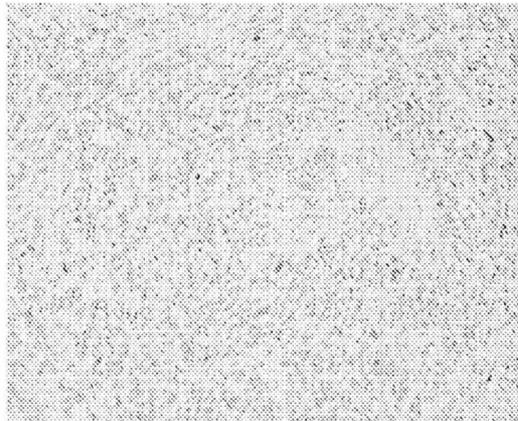


FIG. 54



FIG. 55



FIG. 56

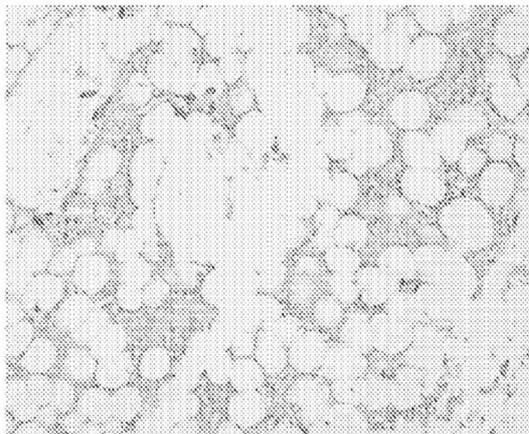


FIG. 57

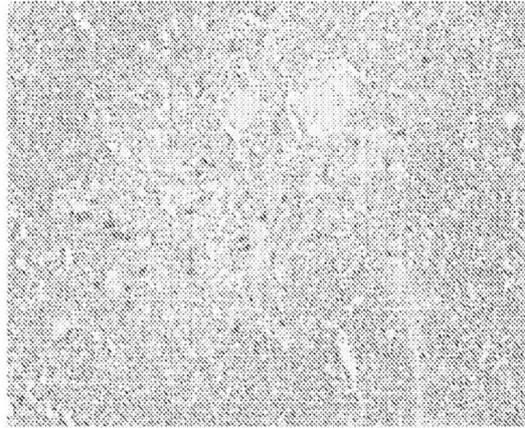


FIG. 58

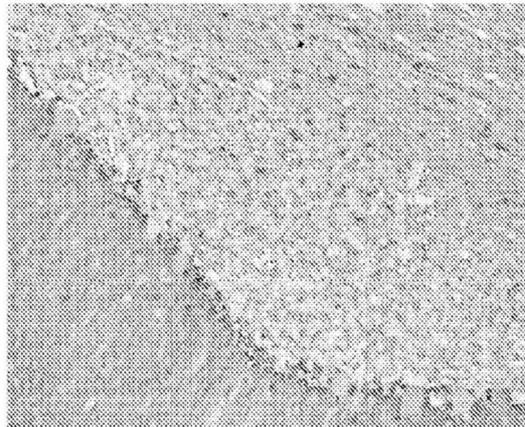


FIG. 59

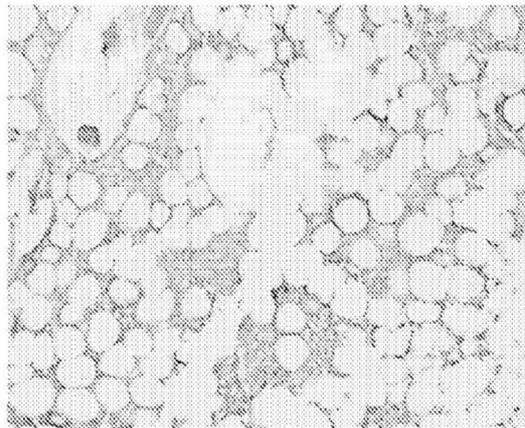


FIG. 60

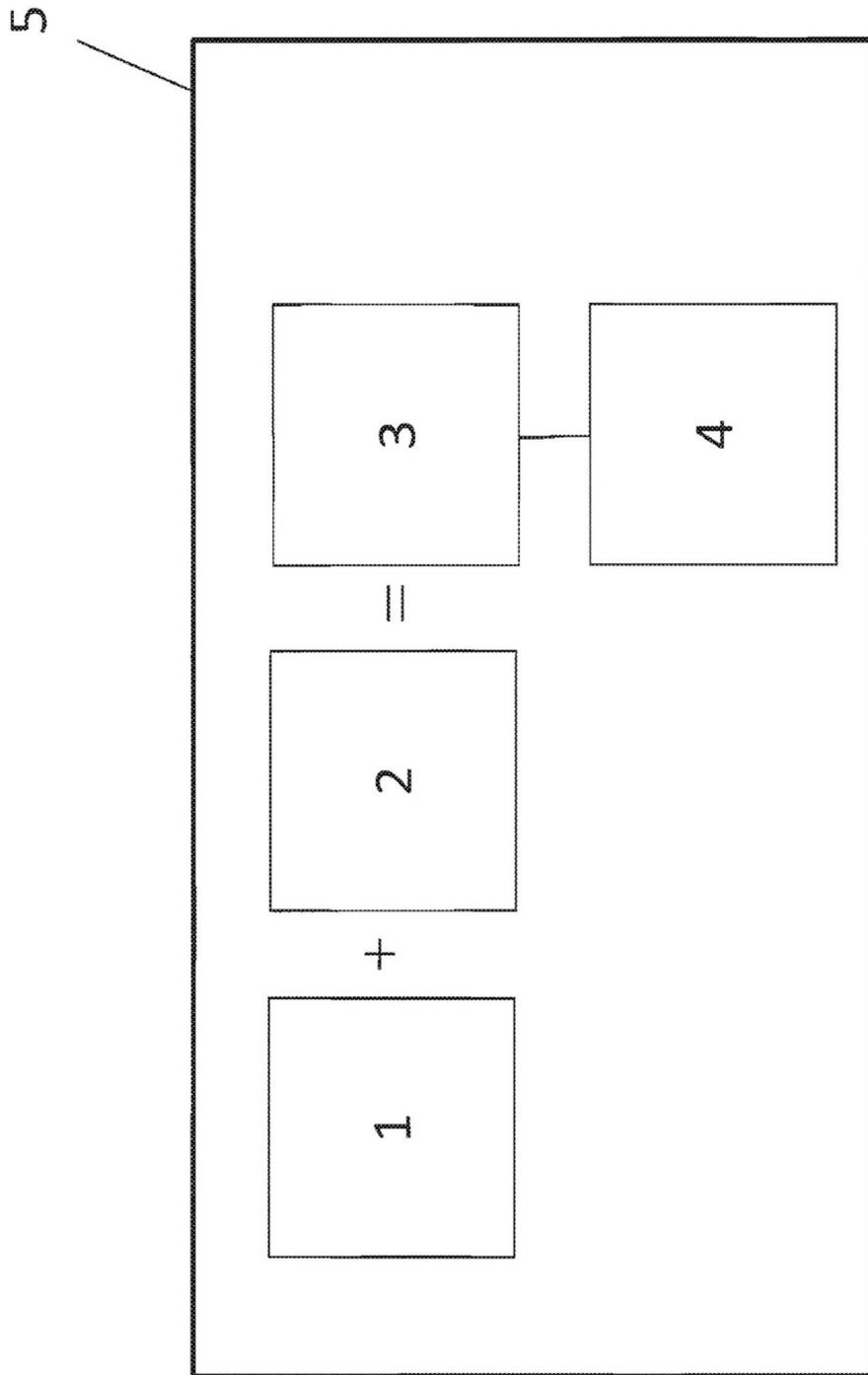


FIG. 61

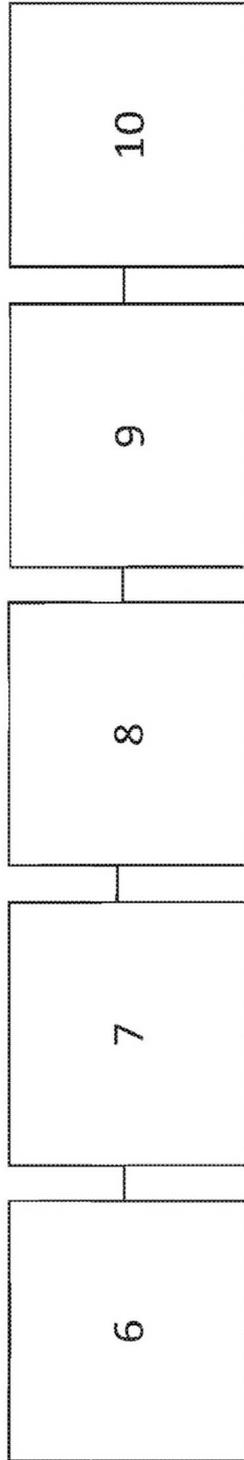


FIG. 62

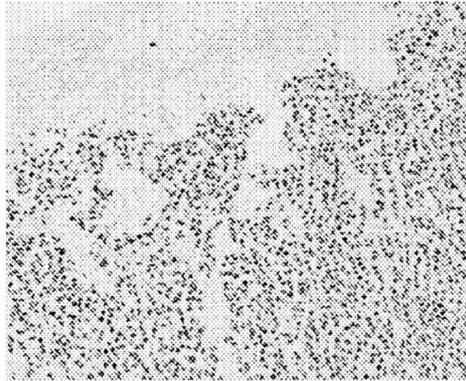


FIG. 63

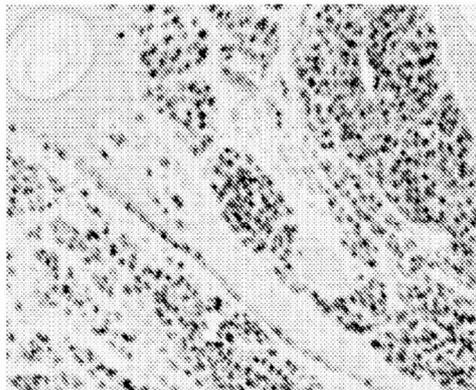


FIG. 64

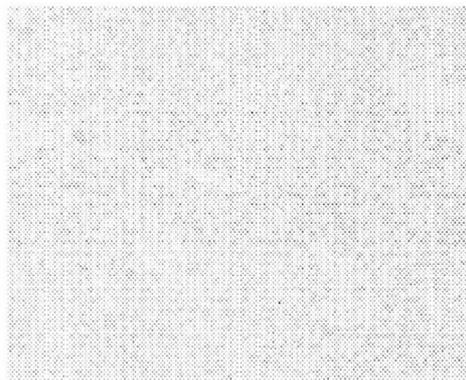


FIG. 65

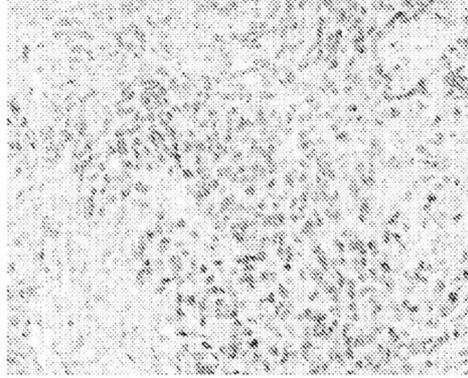


FIG. 66

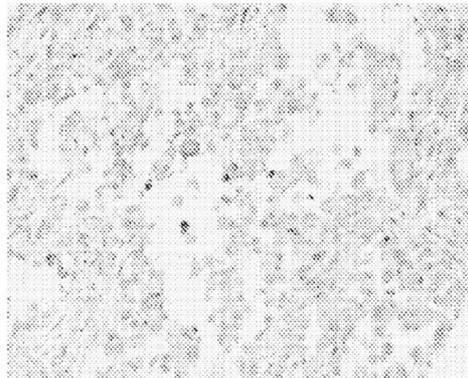


FIG. 67

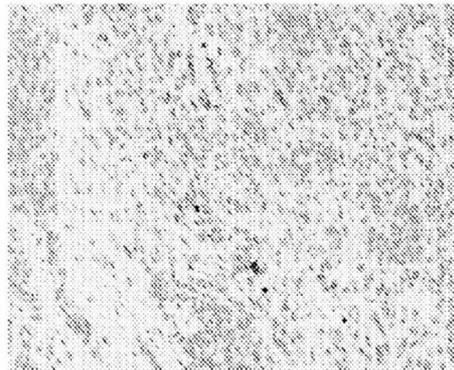


FIG. 68

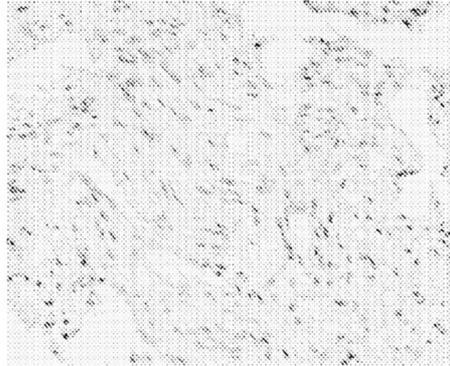


FIG. 69

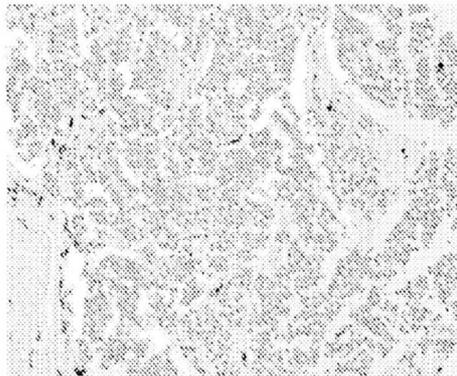


FIG. 70

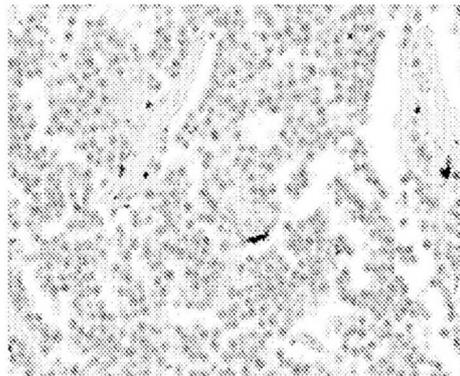


FIG. 71

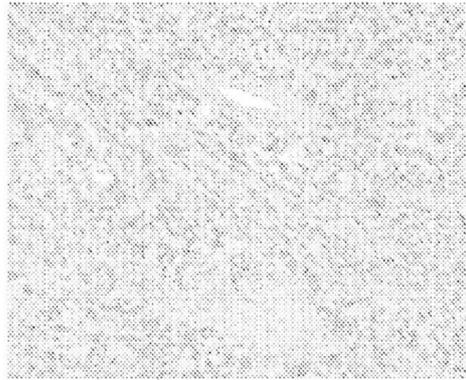


FIG. 72

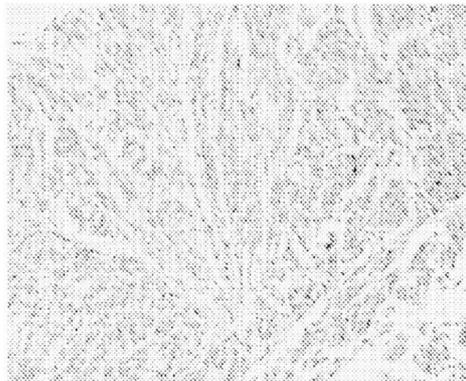


FIG. 73

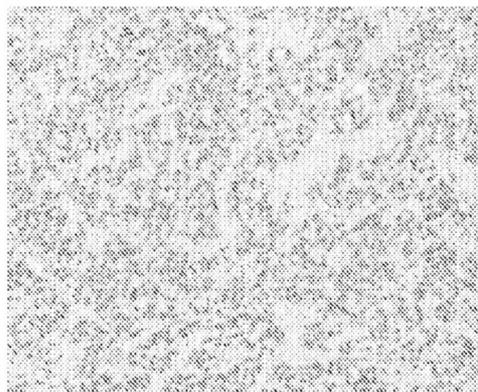


FIG. 74

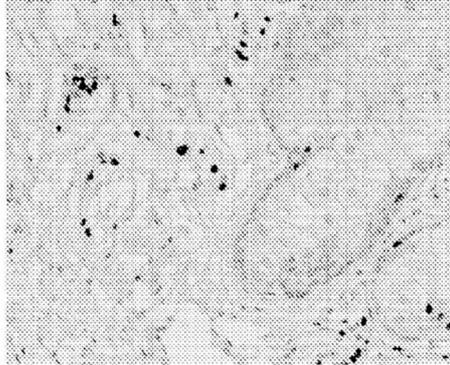


FIG. 75

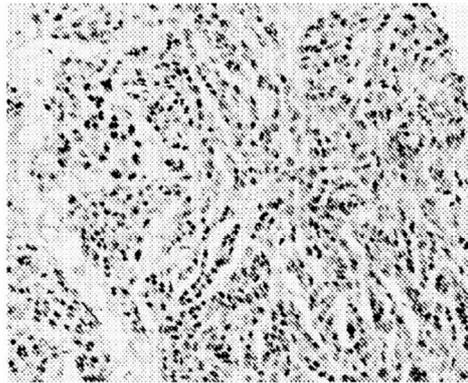


FIG. 76



FIG. 77

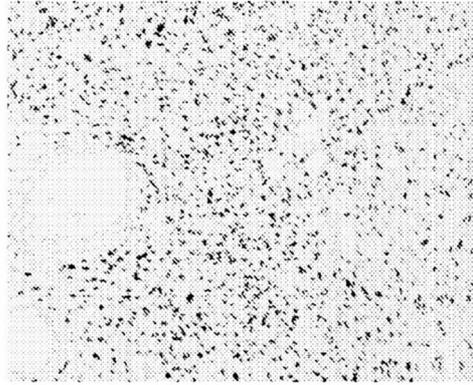


FIG. 78

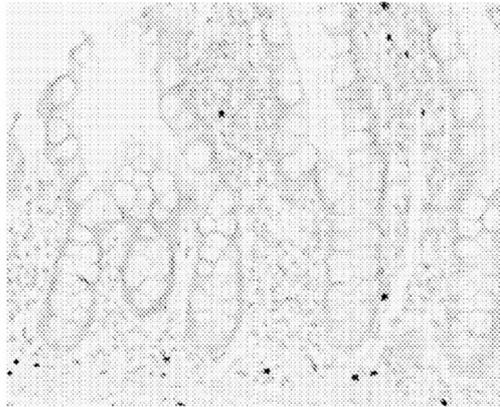


FIG. 79

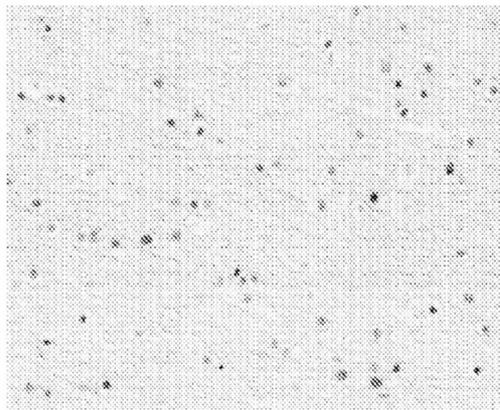


FIG. 80

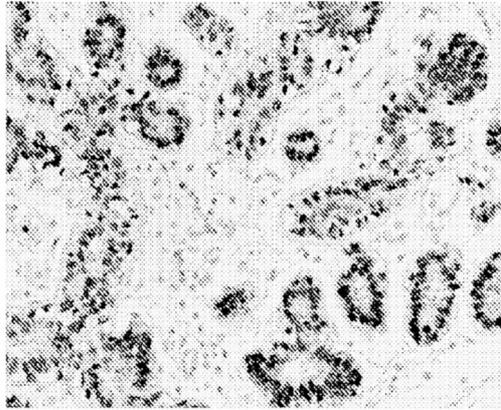


FIG. 81

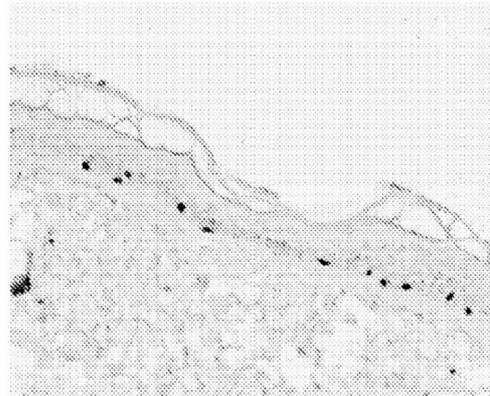


FIG. 82

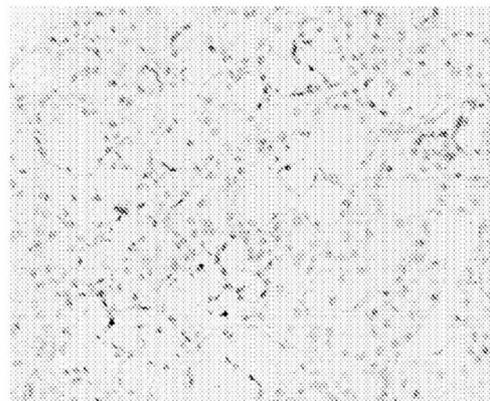


FIG. 83

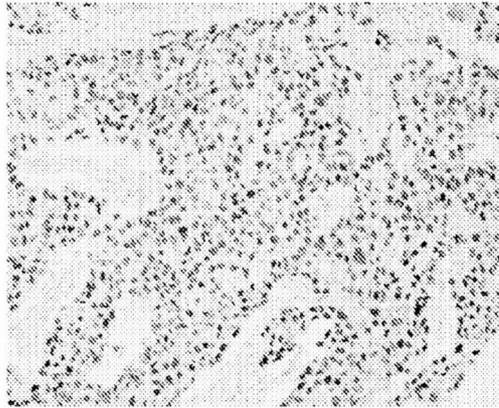


FIG. 84

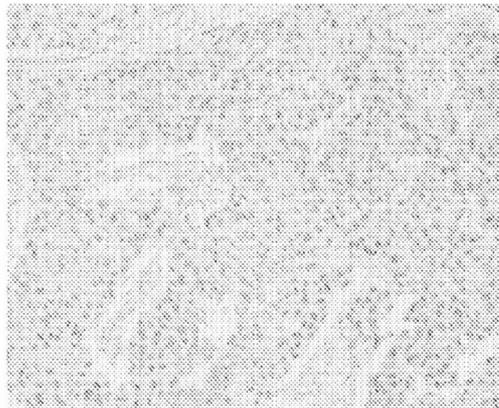


FIG. 85

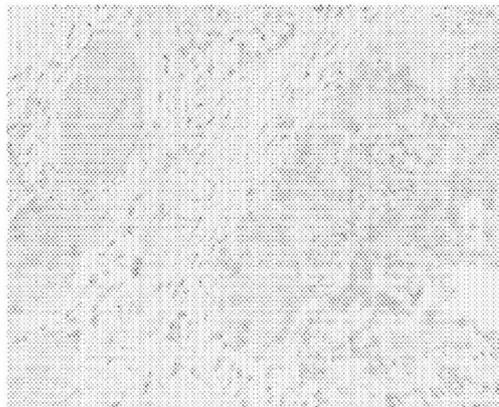


FIG. 86

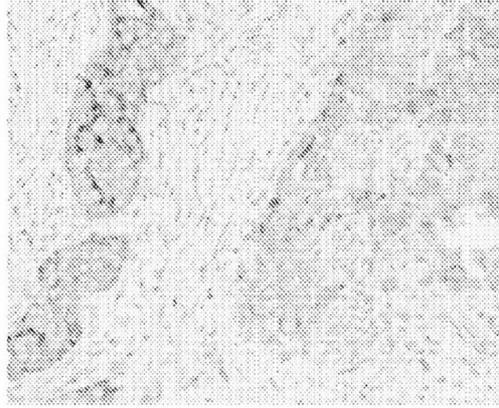


FIG. 87

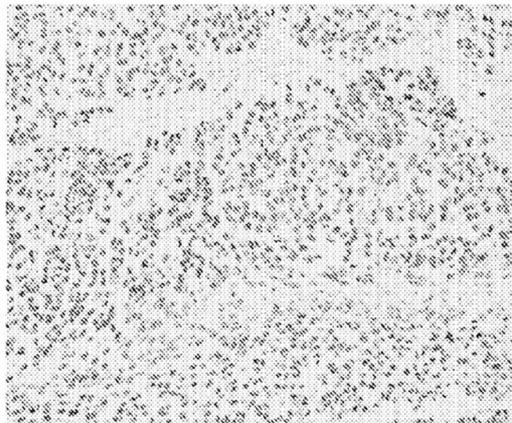


FIG. 88

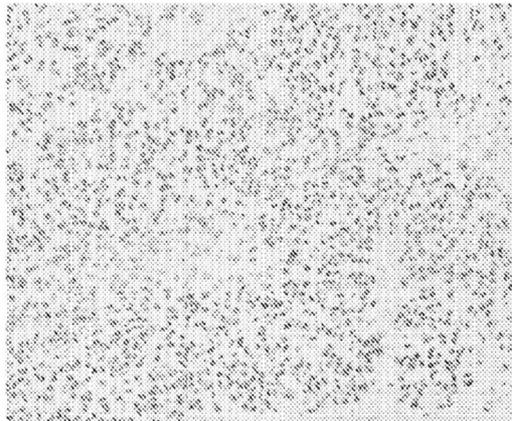


FIG. 89

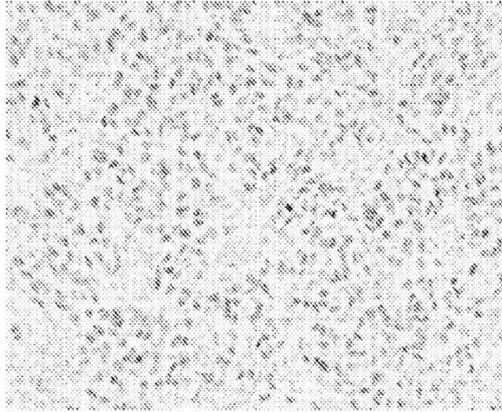


FIG. 90

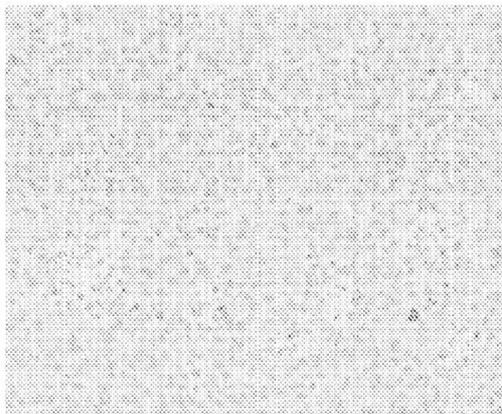


FIG. 91

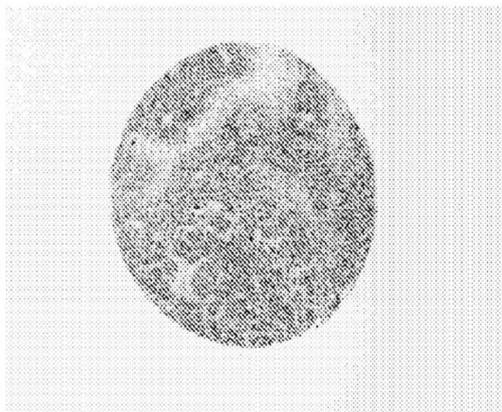


FIG. 92

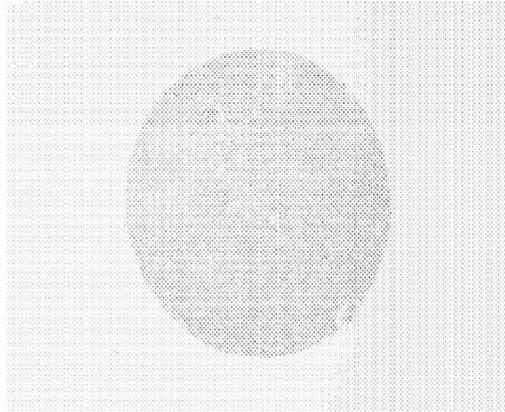


FIG. 93

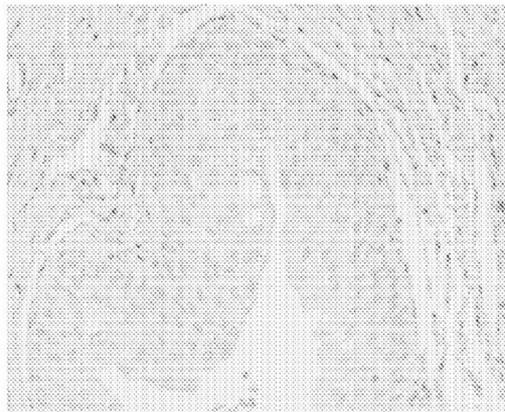


FIG. 94

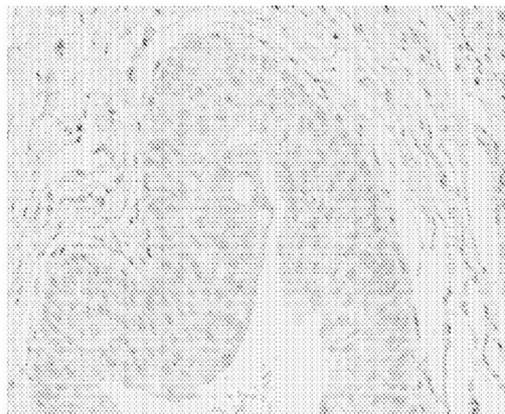


FIG. 95

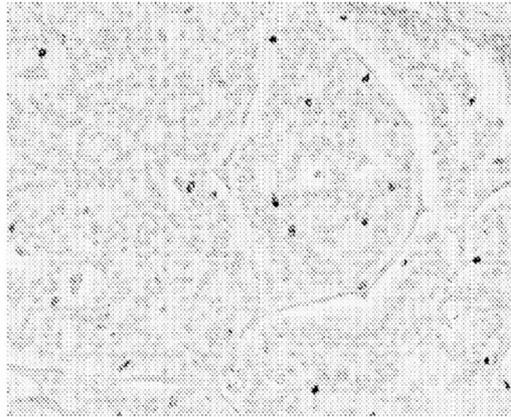


FIG. 96

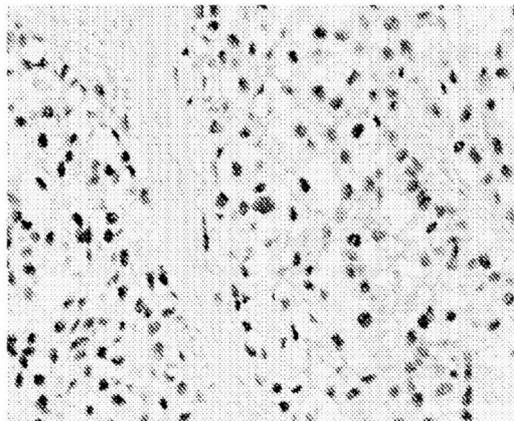


FIG. 97

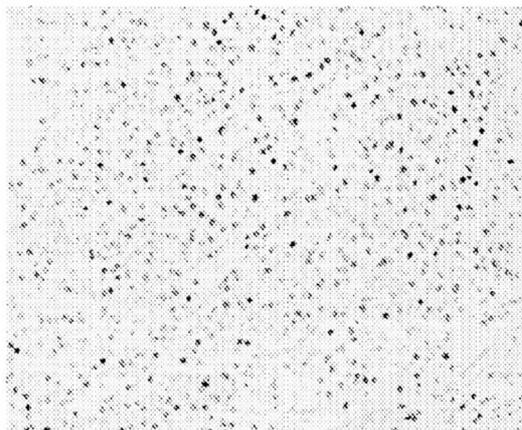


FIG. 98

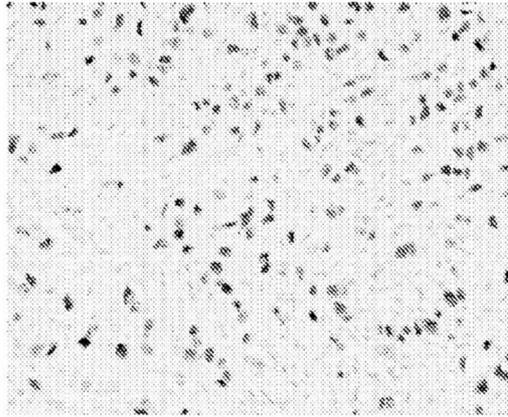


FIG. 99

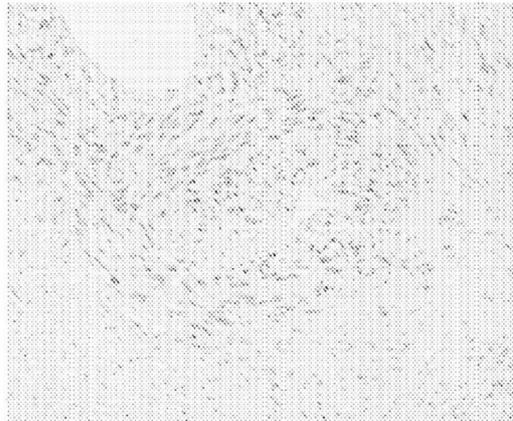


FIG. 100

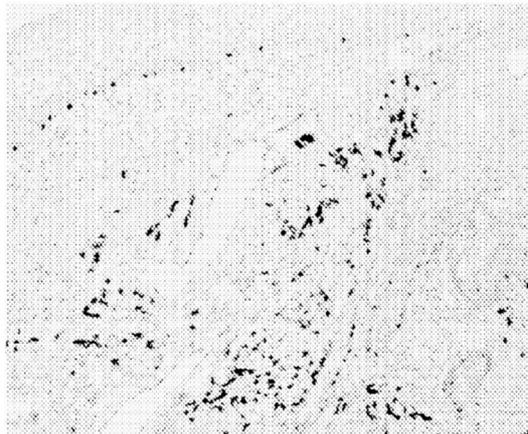


FIG. 101

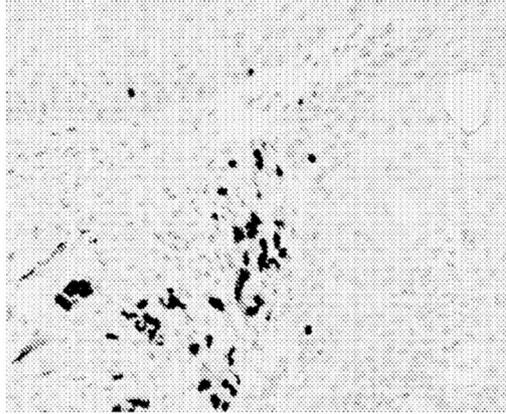


FIG. 102

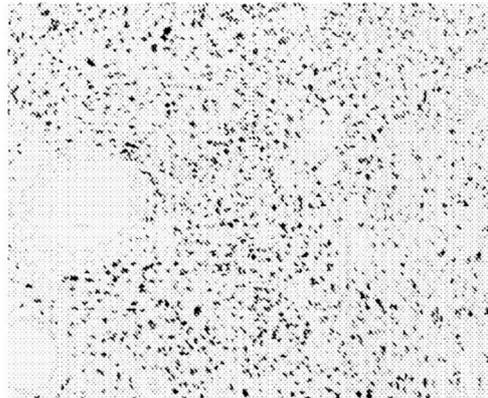


FIG. 103

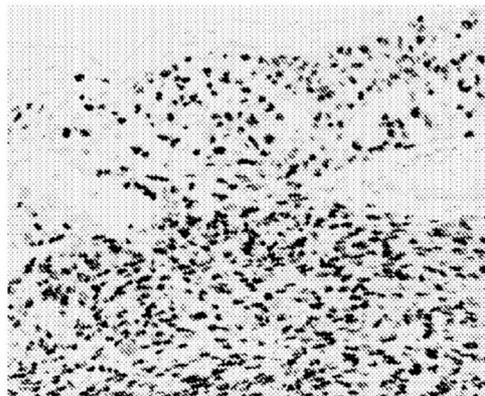


FIG. 104

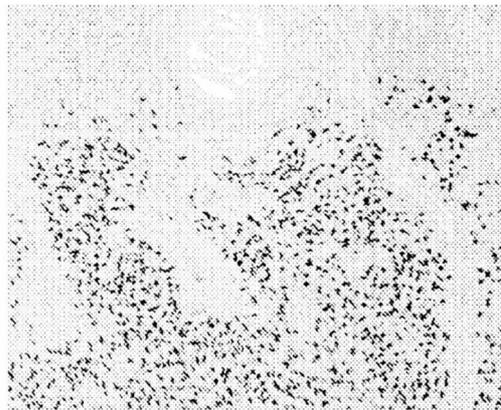


FIG. 105

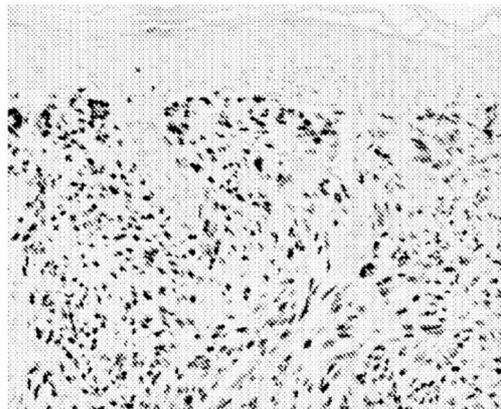


FIG. 106

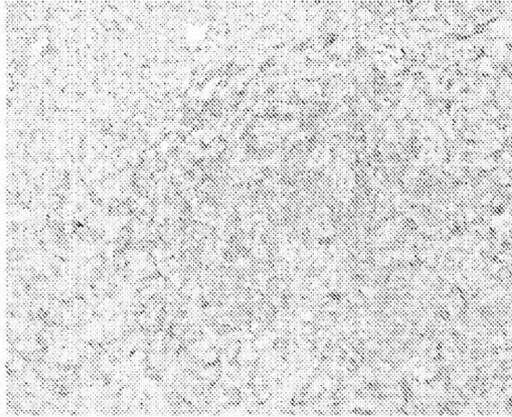


FIG. 107

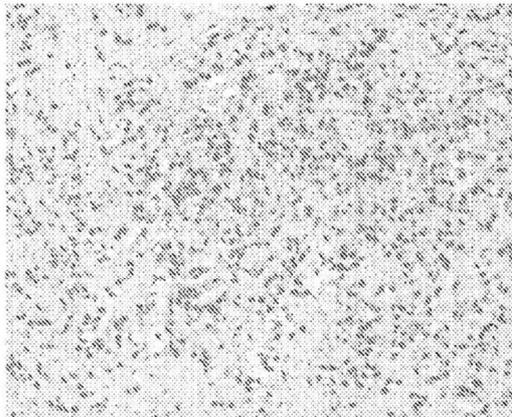


FIG. 108

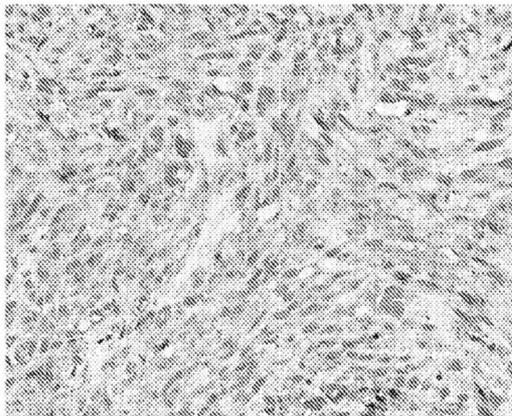


FIG. 109

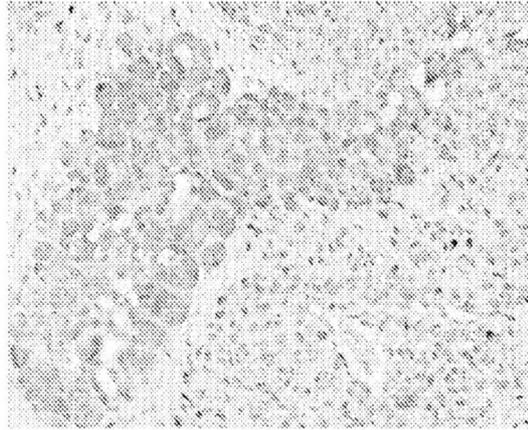


FIG. 110

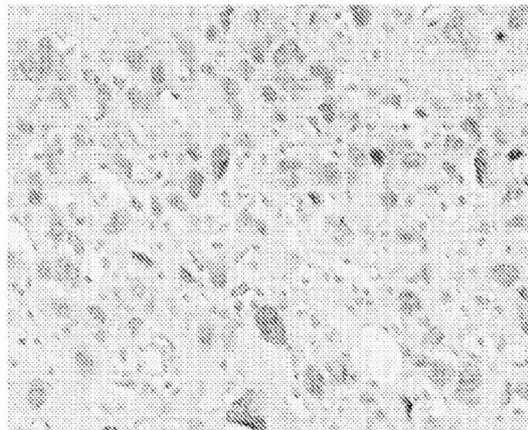


FIG. 111

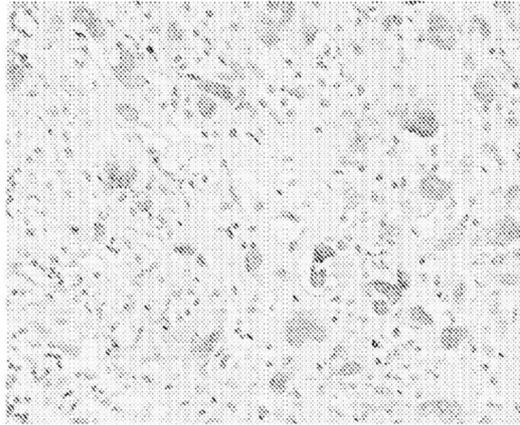


FIG. 112

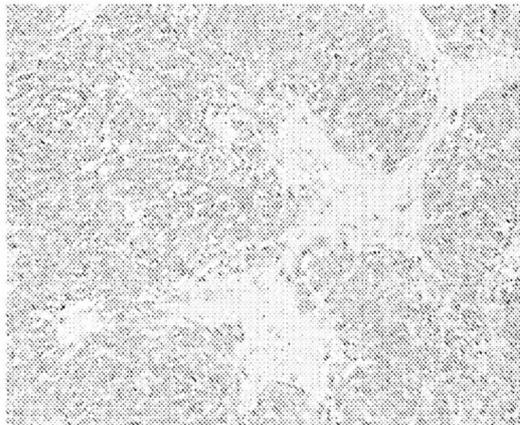


FIG. 113

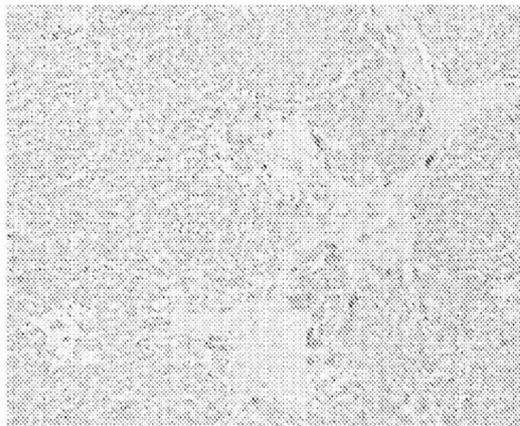


FIG. 114

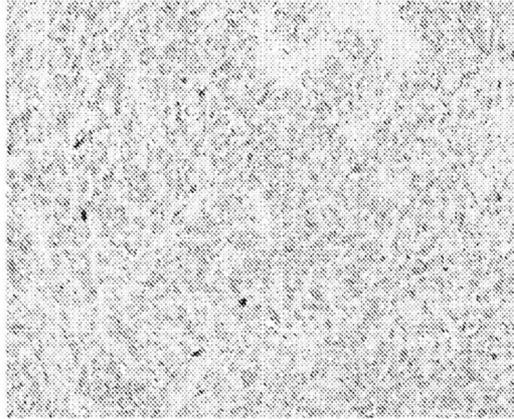


FIG. 115



FIG. 116

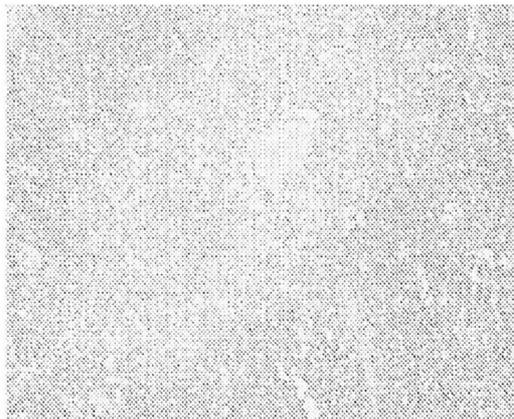


FIG. 117

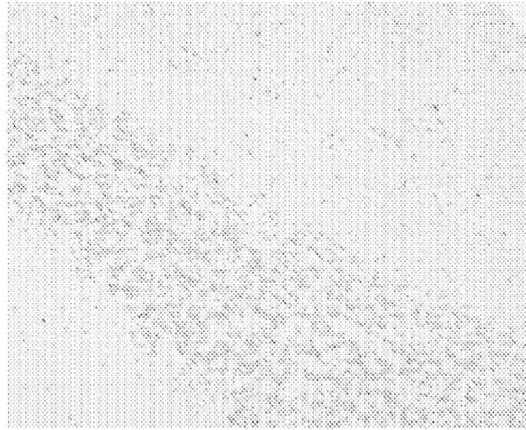


FIG. 118

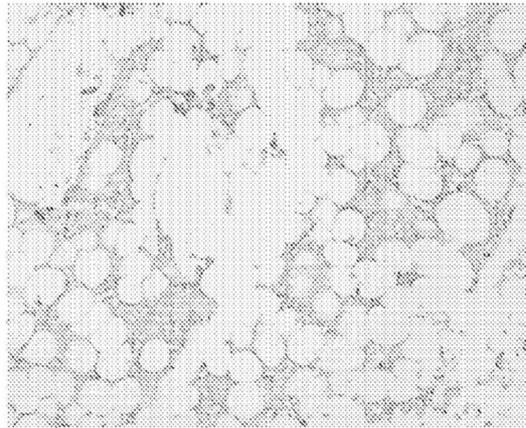


FIG. 119

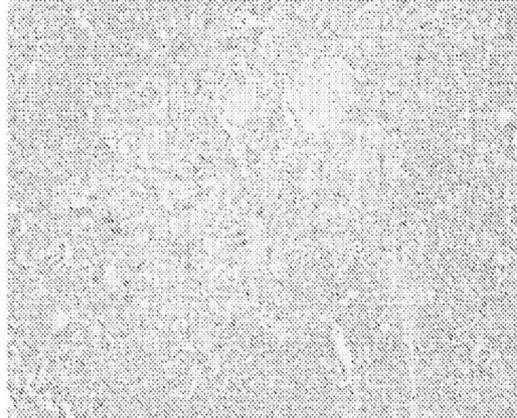


FIG. 120

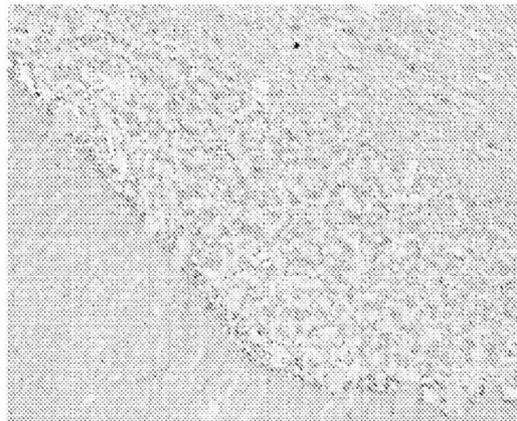


FIG. 121

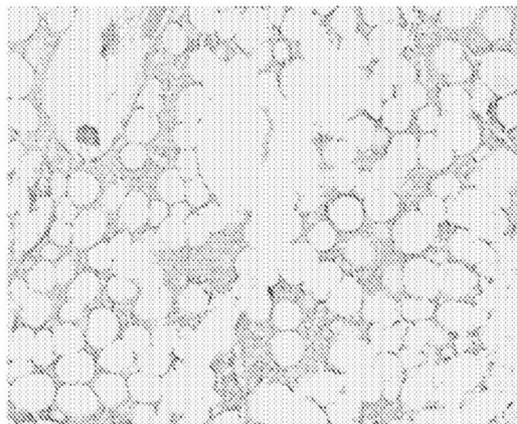


FIG. 122

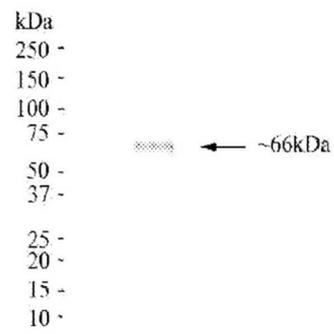


FIG. 123

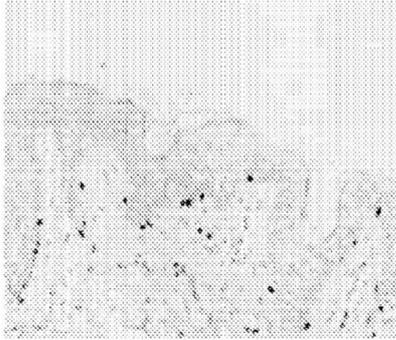


FIG. 124

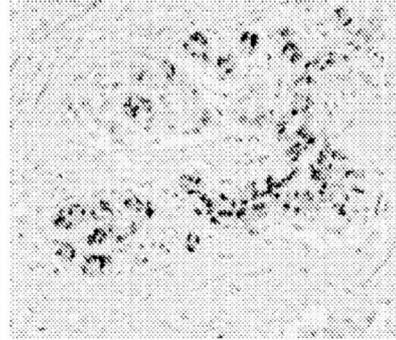


FIG. 125

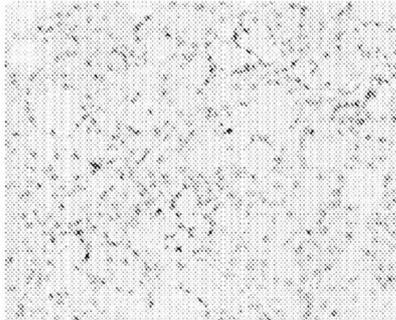


FIG. 126

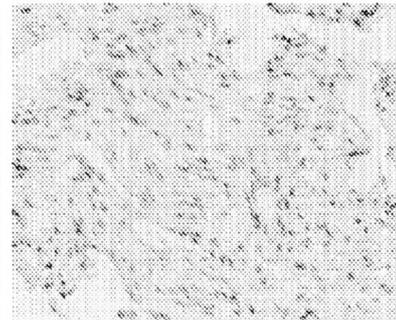


FIG. 127

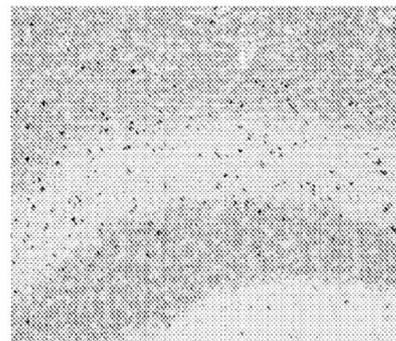


FIG. 128

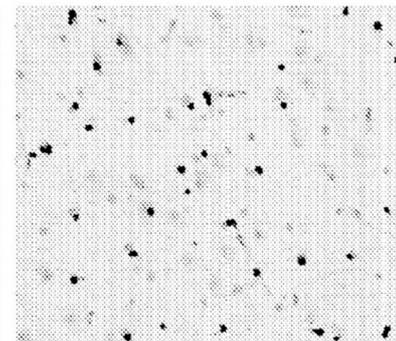


FIG. 129

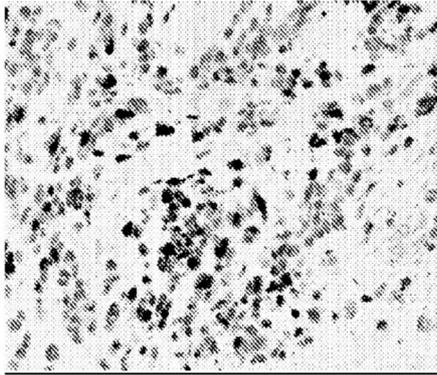


FIG. 130

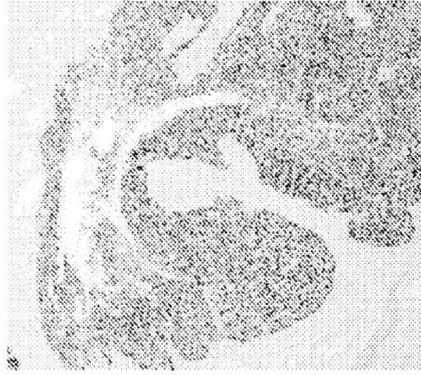


FIG. 131

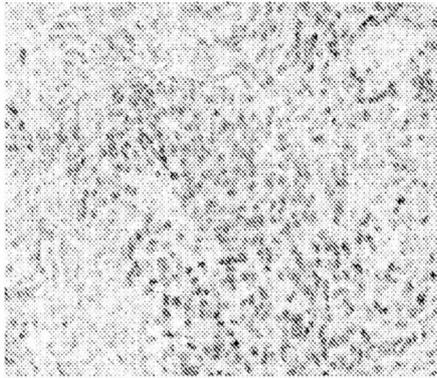


FIG. 132

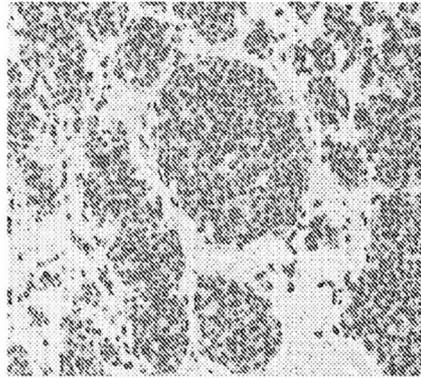


FIG. 133

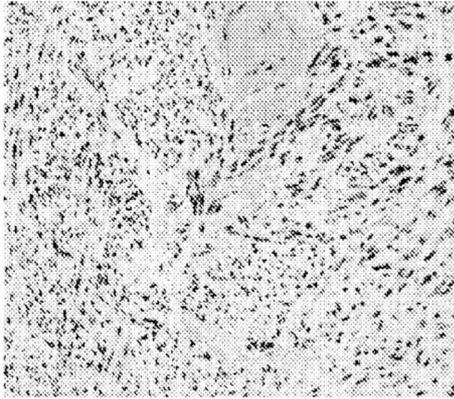


FIG. 134

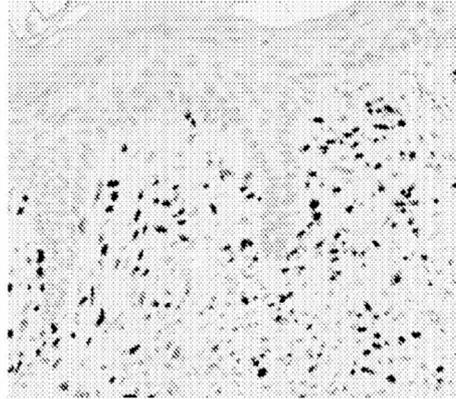


FIG. 135

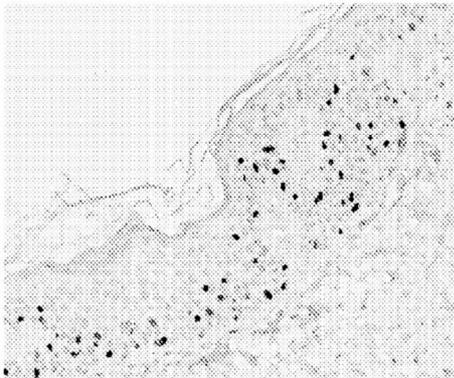


FIG. 136

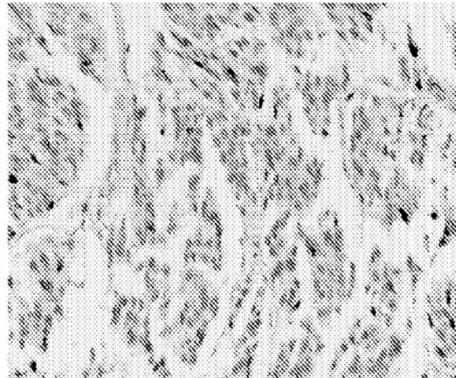


FIG. 137

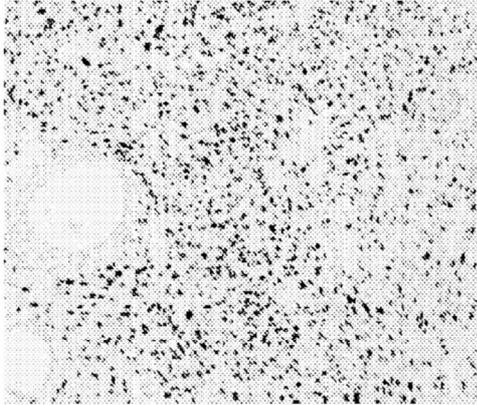


FIG. 138

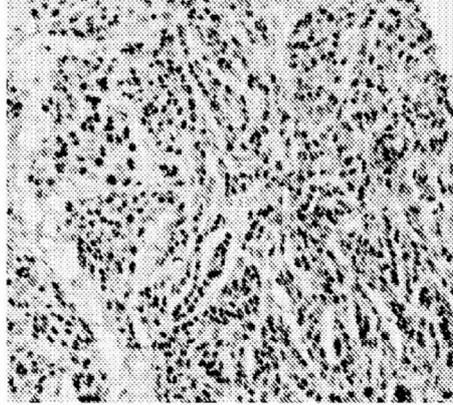


FIG. 139

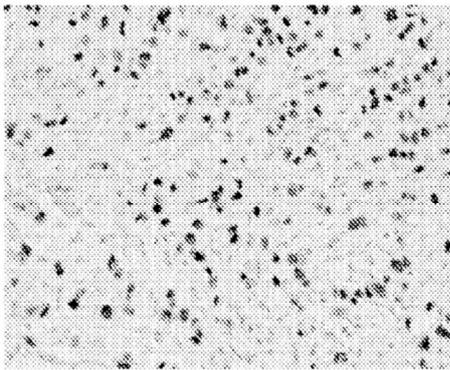


FIG. 140

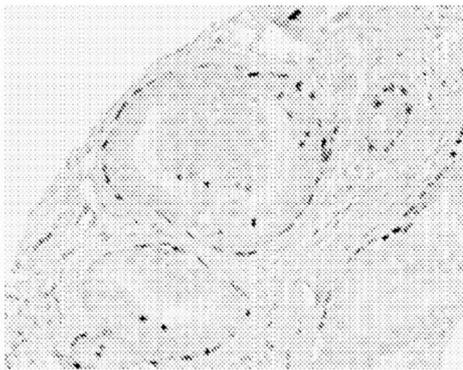


FIG. 141

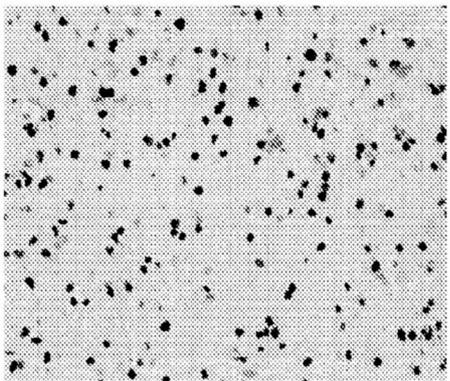


FIG. 142

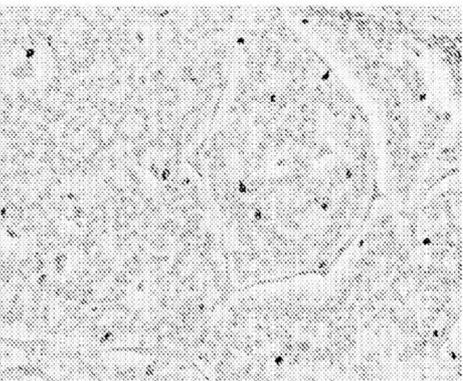


FIG. 143

Figura 123: Transferencia Western de SOX10

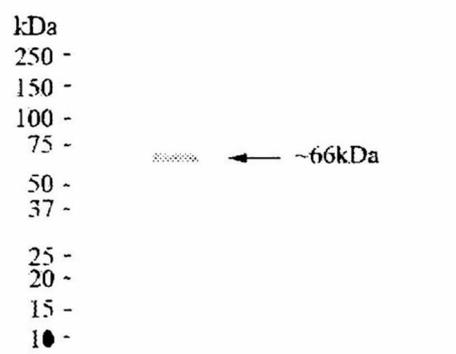
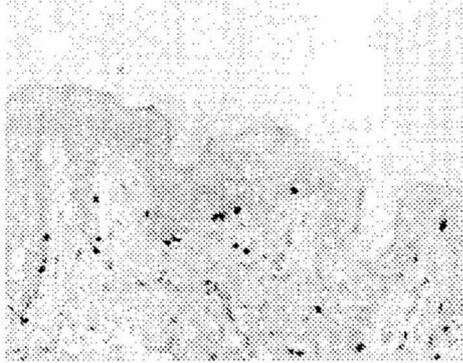
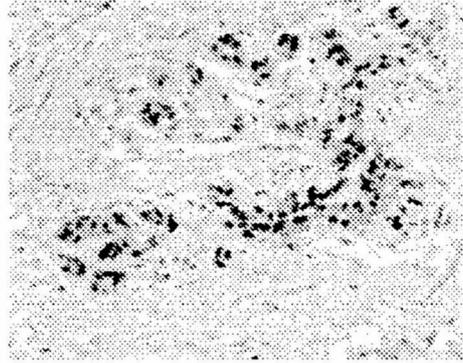


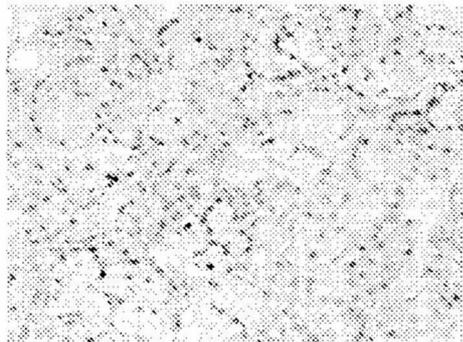
Figura 124 A-F: SOX10 en tejidos normales



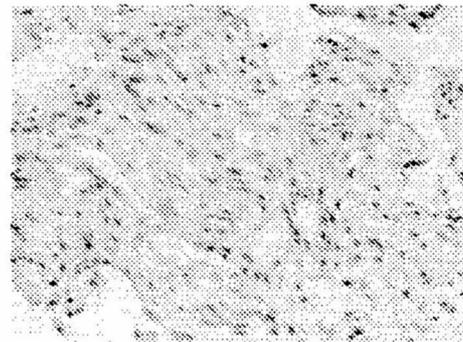
A) Piel normal, 10X



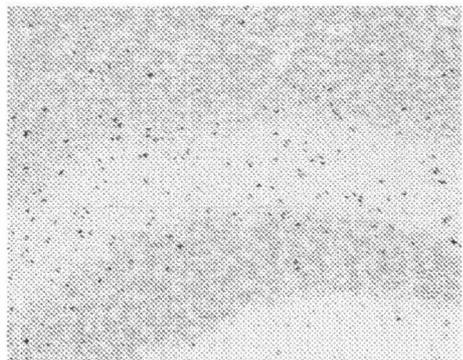
B) Mama normal, 10X



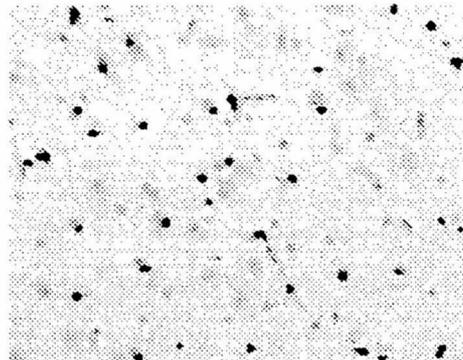
C) Glándula salival normal, 10X



D) Nervio periférico, 10X

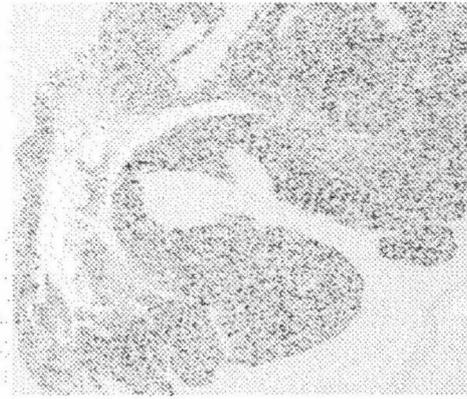
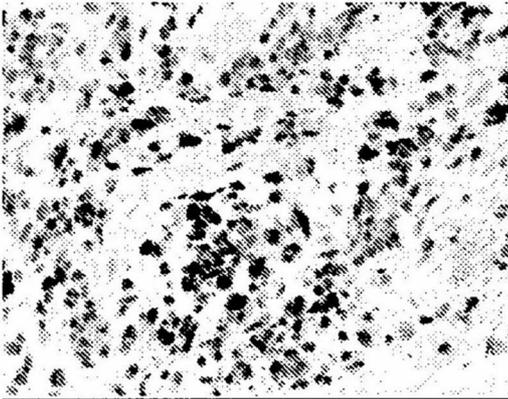


E) Cerebelo, 20X



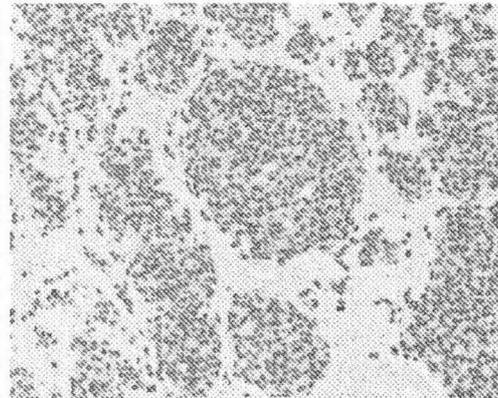
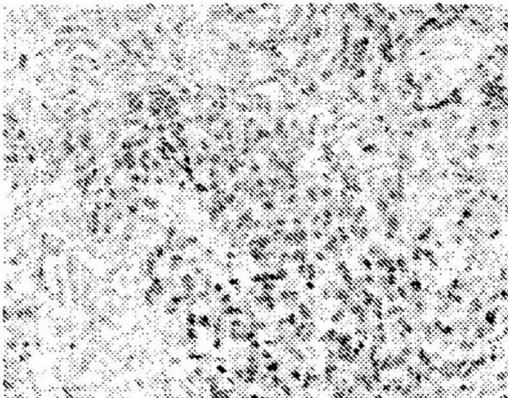
F) Cerebro

Figura 125 A-D: SOX10 en Melanoma



A) Melanoma con pigmento de melanina teñido, 10

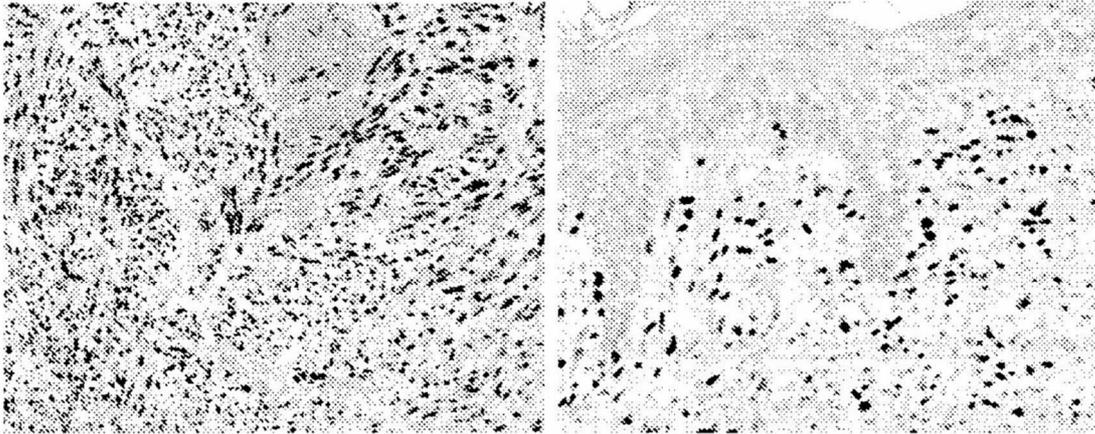
B) Melanoma cutáneo, 2X



C) Melanoma metastásico en ganglio linfático

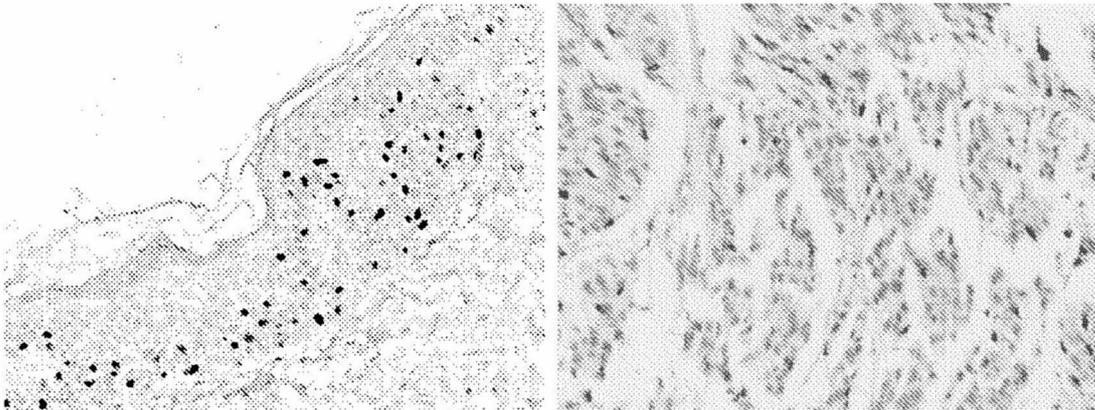
D) Melanoma metastásico en ganglio linfático, 20X

Figura 126 A-D: Expresión de SOX10 en melanomas de células de fusiformes/desmoplásicos/sarcomatoides



A) Melanoma de células fusiformes, 10X

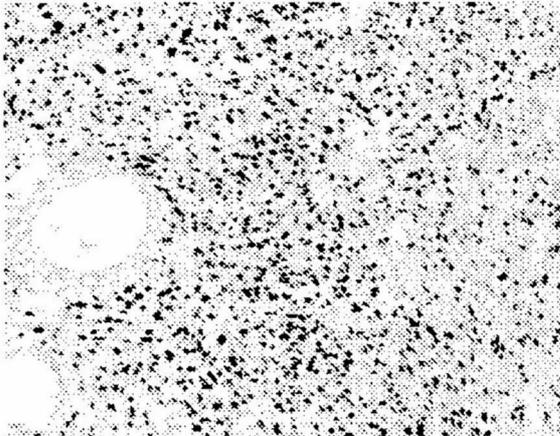
B) Melanoma desmoplásico, 20X



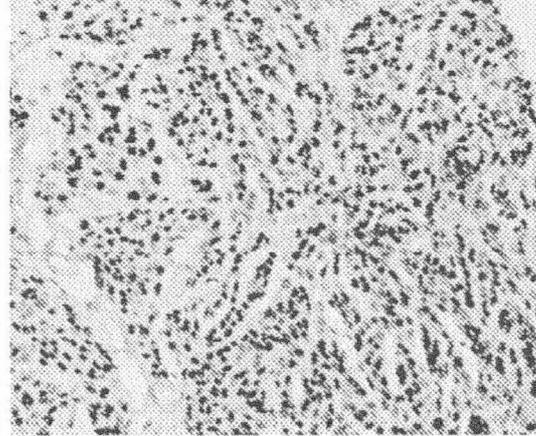
C) Componente *in situ* del melanoma desmoplásico, 20X

D) Melanoma sarcomatoide, 20X

Figura 127 A, B: Expresión de SOX10 en Schwannoma y Nevo

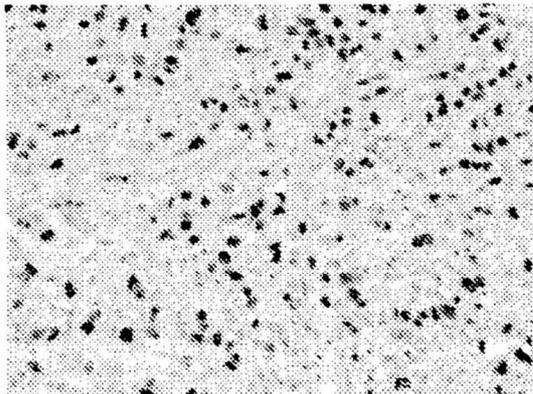


A) Schwannoma, 10X

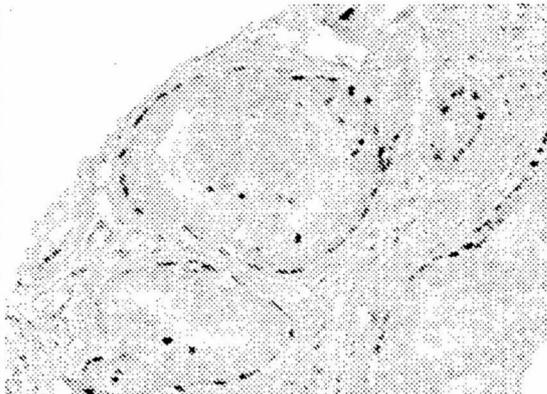


B) Nevo benigno, 20X

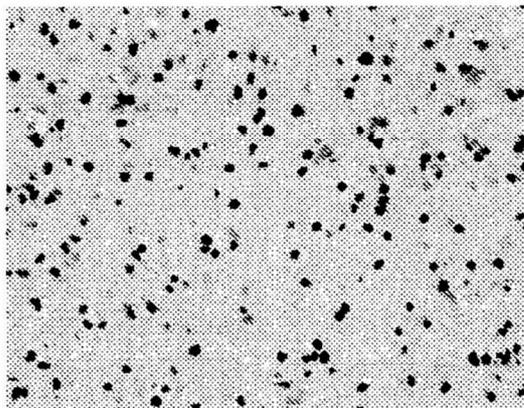
Figura 128 A-D: SOX10 expresado en diversas neoplasias



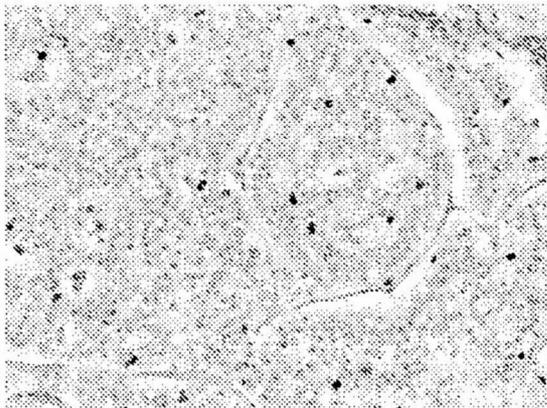
A) Carcinoma ductal invasivo (mama) 20X



B) Células mioepiteliales que rodean al DCIS (mama), 10X



C) Astrocitoma, 20X



D) Carcinoide intestinal, células sustentaculares, 10X

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 61706312 B
- US 13830473 B
- US 2013062043M W
- US 61886448 B
- US 61941907 B
- WO 61886488 A
- WO 61941907 A

Literatura no patente citada en la descripción

- **PALLA et al.** *Am J Dermatopathol*, 2013, vol. 35 (5), 576-581
- **MOHAMED A ; GONZALEZ RS ; LAWSON D ; WANG J ; COHEN C.** SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, 2012
- **PUSCH C ; HUSTERT E ; PFEIFER D.** The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet.*, 1998, vol. 103, 115-123
- **MOLLAAGHABABA R ; PAVAN WJ.** The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene*, 2003, vol. 22, 3024-3034
- **BONDURAND N ; KOBETZ A ; PINGAULT V.** Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett.*, 1998, vol. 432, 168-172
- **BANNYKH SI ; STOLT CC ; KIM J ; PERRY A ; WEGNER M.** Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas. *J Neurooncol.*, January 2006, vol. 76 (2), 115-27
- **BRITSCH S ; GOERICH DE ; RIETHMACHER D.** The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, 66-78
- **BANNYKH SI ; STOLT CC ; KIM J ; PERRY A ; WEGNER M.** Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas. *J Neurooncol.*, January 2006, vol. 76 (2), 115-27
- **FENG Z ; WU X ; CHEN V.** Incidence and survival of desmoplastic melanoma in the United States, 1992-2007. *J Cutan Pathol.*, 2011, vol. 38, 616-624
- **CONLEY J ; LATTES R ; ORR W.** Desmoplastic malignant melanoma. *Cancer*, 1971, vol. 28, 914-916
- **BAER SC ; SCHULTZ D ; SYNNESTVEDT M.** Desmoplasia and neurotropism. Prognostic variables in patients with stage I melanoma. *Cancer*, 1995, vol. 76, 2242-2247
- **GEORGE E ; MCCLAIN SE ; SLINGLUFF CL.** Subclassification of desmoplastic melanoma: pure and mixed variants have significantly different capacities for lymph node metastasis. *J Cutan Pathol.*, 2009, vol. 36, 425-432
- **PALLA B ; SU A ; BINDER S ; DRY S.** SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol.*, July 2013, vol. 35 (5), 576-81
- **SHIN J ; VINCENT JG ; CUDA JD.** Sox10 is expressed in primary melanocytic neoplasms of various histologies, but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses. *J Am Acad Dermatol*, October 2012, vol. 67 (4), 717-26
- **SHIDHAM VB ; CHANG CC.** MCW melanoma cocktail for the evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma. *Expert Rev Mol Diagn*, May 2005, vol. 5 (3), 281-90
- **MIETTINEN M ; FERNANDEZ M ; FRANSSILA K et al.** Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. *Am J Surg Pathol*, February 2001, vol. 25 (2), 205-11
- **NONAKA D ; CHIRIBOGA L ; RUBIN BP.** Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol*, 2008, vol. 32, 1291-1298
- **CIMINO-MATHEWS A ; SUBHAWONG AP ; ELWOOD H.** Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol.*, June 2013, vol. 44 (6), 959-65
- **TSUTA K ; RASO MG ; KALHOR N.** Sox10-positive sustentacular cells in neuroendocrine carcinoma of the lung. *Histopathology*, January 2011, vol. 58 (2), 276-85

5

10

15

- **KARAMCHANDANI JR ; NIELSEN TO ; VAN DE RIJN M ; WEST RB.** SOX10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, October 2012, vol. 20 (5), 445-50
- **NONAKA D ; CHIRIBOGA L ; RUBIN BP.** Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol.*, 2008, vol. 32, 1291-1298
- **KARAMCHANDANI JR.** SOX10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, October 2012, vol. 20 (5), 445-50
- **BUONACCORSI JN ; PRIETO VG ; TORRES-CABALA C ; SUSTER S ; PLAZA JA.** Diagnostic Utility and Comparative Immunohistochemical Analysis of MITF-1 and SOX10 to Distinguish Melanoma In Situ and Actinic Keratosis: A Clinicopathological and Immunohistochemical Study of 70 Cases. *Am J Dermatopathol.*, 18 June 2013
- **AGNARSDÓTTIR M ; SOOMAN L ; BOLANDER A.** SOX10 expression in superficial spreading and nodular malignant melanomas. *Melanoma Res.*, December 2010, vol. 20 (6), 468-78
- **SEONG I ; MIN HJ ; LEE JH.** Sox10 controls migration of B16F10 melanoma cells through multiple regulatory target genes. *PLoS One*, 2012, vol. 7 (2)
- **RAMOS-HERBERTH FI ; KARAMCHANDANI J ; KIM J ; DADRAS SS.** SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. *J Cutan Pathol.*, September 2010, vol. 37 (9), 944-52
- **IVANOV SV ; PANACCIONE A ; NONAKA D.** Diagnostic SOX10 gene signatures in salivary adenoid cystic and breast basal-like carcinomas. *Br J Cancer*, 23 July 2013, vol. 109 (2), 444-51
- **SHIDHAM et al.** MCW melanoma cocktail for the evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma. *Rev Mol Diagn.*, May 2005, vol. 5 (3), 281-90
- **MIETTININ M ; FERNANDEZ M ; FRANSSILA K et al.** *Am J Surge Pathol.*, February 2001, vol. 25 (2), 205-11
- **AMR MOHAMED, MD ; RAUL S ; GONZALEZ, MD et al.** SOX10 Expression in Malignant Melanoma, Carcinoma, and Normal Tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2012
- **PUSCH C ; HUSTERT E ; PFEIFER D et al.** The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet.*, 1998, vol. 103, 115-123
- **BONDURAND N ; KOBETZ A ; PINGAULT V et al.** Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett.*, 1998, vol. 432, 168-172
- **BANNYKH SI ; STOLT CC ; KIM J ; PERRY A ; WEGNER M.** Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas. *J Neurooncol.*, January 2006, vol. 76 (2), 115-127
- **BRITSCH S ; GOERICH DE ; RIETHMACHER D et al.** The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, 66-78
- **FENG Z ; WU X ; CHEN V et al.** Incidence and survival of desmoplastic melanoma in the United States, 1992-2007. *J Cutan Pathol*, 2011, vol. 38, 616-624
- **BUSAMKJ.** Desmoplastic melanoma. *Clin Lab Med.*, June 2011, vol. 31 (2), 321-330
- **GEORGE E ; MCCLAIN SE ; SLINGLUFF CL et al.** Subclassification of desmoplastic melanoma: pure and mixed variants have significantly different capacities for lymph node metastasis. *J Cutan Pathol*, 2009, vol. 36, 425-432
- **PALLA B ; SU A ; BINDER S ; DRY S.** SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol*, July 2013, vol. 35 (5), 576-581
- **SHIN J ; VINCENT JG ; CUDA JD et al.** Sox10 is expressed in primary melanocytic neoplasms of various histologies, but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses. *J Am Acad Dermatol.*, October 2012, vol. 67 (4), 717-726
- **PALLA B ; SU A ; BINDER S ; DRY S.** SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol.*, July 2013, vol. 35 (5), 576-581
- **RAMOS-HERBERTH FI ; KARAMCHANDANI J ; KIM J et al.** SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. *J Cutan Pathol*, 2010, vol. 37, 944-952
- **KARAMCHANDANI JR et al.** SOX10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, October 2012, vol. 20 (5), 445-450
- **TSUTA K ; RASO MG ; KALHOR N et al.** Sox10-positive sustentacular cells in neuroendocrine carcinoma of the lung. *Histopathology*, January 2011, vol. 58 (2), 276-285
- **CIMINO-MATHEWS A ; SUBHAWONG AP ; ELWOOD H et al.** Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas. *Hum Pathol*, June 2013, vol. 44 (6), 959-965
- **ZHONG WD ; QINGQ ; DAIQS et al.** SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. *BMC Cancer*, 15 June 2012, vol. 12, 248