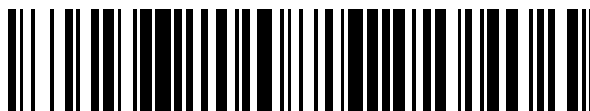


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 055**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2009 PCT/EE2009/000001**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2009 WO09092385**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2009 E 09703627 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2245465**

54 Título: **Una nueva molécula asociada a tumores humanos metastásicos, métodos para detectar tanto el gen activado como la proteína y para interferir con la expresión génica**

30 Prioridad:

**25.01.2008 US 62453 P**

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

**20.10.2016**

73 Titular/es:

**HANSABIOMED OU (100.0%)  
Aiavilja 3-5  
90505 Haapsalu, EE**

72 Inventor/es:

**LOZUPONE, FRANCESCO y  
FAIS, STEFANO**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 587 055 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

Una nueva molécula asociada a tumores humanos metastásicos, métodos para detectar tanto el gen activado como la proteína y para interferir con la expresión génica

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente al campo de la investigación del cáncer y más específicamente a la identificación de nuevos genes y proteínas relacionados con tumorigénesis y metástasis. La invención se refiere a un nuevo marcador de malignidad. La invención se refiere además al campo de terapia génica.

10

**Antecedentes de la técnica**

En 2005, de los 58 millones de muertes en todo el mundo 7,6 millones de personas murieron de cáncer. Basándose en proyecciones, las muertes por cáncer seguirán aumentando con una estimación de 9 millones de personas que morirán de cáncer en 2015, y 11,4 millones que morirán en 2030 (datos de la OMS). El tratamiento del cáncer puede implicar cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, o alguna combinación de las mismas, pero las tasas de supervivencia actuales para la mayoría de los pacientes con cáncer son muy bajas. Según la Organización Mundial de la Salud, un tercio de la carga de cáncer podría curarse si se detecta pronto y se trata adecuadamente. La investigación patológica proporciona medios para establecer el diagnóstico de la mayoría de los tumores sólidos. Aunque muchos casos pueden clasificarse de manera fiable con los criterios patológicos actuales, existe un subconjunto significativo de casos en los que no puede alcanzarse un consenso incluso entre patólogos expertos. La ambigüedad de diagnóstico tiene consecuencias adversas significativas para los pacientes. La clasificación errónea de un tumor como benigno puede ser mortal, y diagnosticar una lesión benigna como maligna puede dar como resultado una morbilidad significativa. Actualmente no existe un método para resolver definitivamente estas ambigüedades. Por tanto, existe una necesidad clara de una prueba de diagnóstico que pueda reducir estas incertidumbres.

15

20

25

Fagocitosis es el proceso mediante el cual las células interiorizan partículas grandes (normalmente 0,1 mm de diámetro), tales como bacteria o restos celulares. La etapa temprana de fagocitosis puede dividirse provisionalmente en etapas distintivas: unión de la membrana celular alrededor de la partícula, formación del fagosoma e internalización del fagosoma. En el proceso de la formación del fagosoma e internalización, se ha propuesto que el citoesqueleto de actina dirige estas etapas para permitir la absorción.

30

Se han identificado células fagocíticas en tumores malignos desde hace un siglo, y, más recientemente, se han detectado células con comportamiento fagocítico (también definido como comportamiento caníbal) en tumores de diferente histología, tal como carcinoma de células de avena del pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, meduloblastoma, adenocarcinomas gástricos, melanoma y carcinoma de células escamosas de la piel.

35

Recientemente se ha observado que la fagocitosis es un carácter de células de melanoma metastásico que pueden fagocitar células apoptóticas, levaduras teñidas con perlas de plástico y linfocitos vivos que presentan una maquinaria fagocítica eficaz responsable de una actividad de tipo macrófago, mientras que células de melanoma derivadas de lesiones primarias no presentaron ninguna actividad caníbal o fagocítica. Además, pueden detectarse células caníbales en el 100% de las lesiones de melanoma metastásico (Lugini *et al.*, 2004; Lugini *et al.*, 2006).

40

Una de las características principales de células caníbales es una acidez aumentada de vesículas de tipo lisosómico y una sobreexpresión de catepsina B, una enzima proteolítica que se notifica que está implicada en la invasión tumoral y metástasis (Sloane *et al.*, 1981). A diferencia de macrófagos de tipo fagocito profesionales, las células tumorales caníbales no utilizan estructuras de tipo pliegue o cualquier movimiento por pseudopodios. En cambio, la materia viva o muerta que toca la membrana externa de la célula tumoral se somete a endocitosis inmediatamente y se digiere a través de un tipo de mecanismo de *arenas movedizas* que parece no implicar ningún receptor específico.

45

50

Estos hallazgos han llevado a especular que las células caníbales se alimentan de otras células, quizás sin una necesidad particular de suministro de nutrientes derivado de la sangre, pero también que el canibalismo de linfocitos por células tumorales puede representar un mecanismo rudimentario de escape inmunitario tumoral. Además, estos hallazgos conducen a una interpretación novedosa, revolucionaria de que células cancerosas, en su hábito de usar otras células para alimentarse, pueden comportarse como eucariotas unicelulares cuyo único propósito es sobrevivir en una lucha continua contra otras células y el entorno desfavorable. Esta teoría conduce además a especular que amebas y células metastásicas pueden compartir el mismo armazón con los mismos elementos reguladores permitiendo su supervivencia en condiciones microambientales adversas. Sin embargo, hasta ahora nunca se han asociado genes específicamente con el comportamiento caníbal de células cancerosas.

55

60

El mohó mucilaginoso celular *Dictyostelium discoideum* se ha usado previamente como organismo modelo para estudiar la fagocitosis. Los mecanismos implicados en la fagocitosis por células de *Dictyostelium* son muy similares a los usados por fagocitos de mamífero, e implican el citoesqueleto de actina y RacF1, un miembro de la familia Rho

65

de proteínas de unión a GTP. Sin embargo, nunca se han identificado proteínas específicas asociadas con fagocitosis en mamíferos.

5 Recientemente se ha encontrado que la proteína codificada por el gen *PHGIA* estaba implicada en adhesión celular y fagocitosis en la ameba *Dictyostelium discoideum*. Esta proteína pertenece a la superfamilia TM9 y los genes que  
 10 codifican para proteínas TM9 pueden identificarse inequívocamente en genomas eucariotas. La familia incluye muchos miembros en organismos desde levaduras hasta plantas y seres humanos. Para mencionar algún ejemplo, existen tres miembros de esta familia en *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium amoebae* y moscas *Drosophila* y cuatro en seres humanos y ratones. Todos ellos presentan una estructura global similar, con un dominio luminal potencial bastante variable seguido por un dominio de membrana más conservado y nueve o diez dominios transmembrana putativos.

**Sumario de la invención**

15 La materia de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Basándose en la teoría de que células cancerosas usan otras células para alimentarse y se comportan como eucariotas unicelulares y posiblemente comparten el mismo armazón con los mismos elementos reguladores que las amebas, se comparó el gen *PHGIA* con el genoma humano. Se han secuenciado completamente tres homólogos de  
 20 *phgl* en seres humanos (TM9SF4, U81006 y U94831), y se encontró que el homólogo más cercano de *phgl* de *Dictyostelium dicoideum* en seres humanos es *tm9sf4* (otros nombres: KIAA0255, dJ836N17.2) localizado en el cromosoma 20q1 1.21. Incluso si este gen está completamente secuenciado, su función o producto de expresión del mismo nunca se ha caracterizado.

25 Por consiguiente, se ha estudiado la función y la expresión de la proteína codificada por *tm9sf4* en más detalle. En esta divulgación, se muestra la función de la proteína y se proporcionan varias aplicaciones.

Esta divulgación muestra que la proteína está altamente expresada en células malignas. Observaciones en varias líneas celulares de melanoma derivadas de pacientes muestran que TM9SF4 es un marcador de malignidad, ya que  
 30 esta proteína es indetectable en las líneas celulares derivadas de lesiones primarias. Además, esta proteína está implicada en el comportamiento fagocítico de células de melanoma metastásico, ya que el silenciamiento del gen que codifica para esta proteína inhibe fuertemente el comportamiento fagocítico de células metastásicas. Basándose en estas observaciones se ha nombrado esta proteína como TUCAP-I (*Tumor associated cannibal protein 1*, proteína caníbal asociada a tumores 1). El gen que codifica para esta proteína por consiguiente se nombra gen  
 35 *tucap-1*.

Esta invención aborda la necesidad de una prueba rápida para detectar células malignas y diagnosticar melanoma y otros tumores. Por consiguiente, esta divulgación proporciona anticuerpos, cebadores, oligopéptidos y polipéptidos  
 40 útiles para la detección, el análisis y los efectos terapéuticos potenciales de TUCAP-I.

También se describen polinucleótidos que corresponden o son complementarios a todo o parte del gen *tucap-1*, y polinucleótidos u oligonucleótidos, que se hibridan con el gen *tucap-1*, los ARNm, o a polinucleótidos que codifican  
 45 para TUCAP-1. Se proporcionan moléculas de ADN recombinante que contiene polinucleótidos de TUCAP-1, células transformadas o transducidas con tales moléculas y sistemas de huésped-vector para la expresión de productos del gen *tucap-1*. La divulgación además proporciona proteína TUCAP-1 y fragmentos de polipéptido de la misma.

Además se describen anticuerpos que se unen a proteínas TUCAP-1 y fragmentos de polipéptido de las mismas, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos murinos y de otros mamíferos, anticuerpos  
 50 quiméricos, anticuerpos humanizados y completamente humanos, y anticuerpos marcados con un marcador detectable, y anticuerpos conjugados con radionucleótidos, toxinas u otras composiciones terapéuticas. La invención describe además métodos para detectar la presencia de polinucleótidos y proteínas TUCAP-1 en diversas muestras biológicas, así como métodos para identificar células que expresan TUCAP-1.

**Breve descripción de los dibujos**

55 Figura 1. Estructura molecular de la proteína TM9SF4/TUCAP-1.

(A) Perfil de hidrofobicidad de la secuencia de proteína TUCAP-1. Las regiones hidrófobas se indican encima de la línea mediante valores positivos. La numeración de aminoácidos se indica en el eje de abscisas. El tramo hidrófilo  
 60 en la región N-terminal está seguido por nueve regiones hidrófobas. El análisis se realizó según Claros y von Heijne usando el programa de predicción TopPred.

(B) Representación gráfica de la estructura secundaria de TUCAP-1 según el servidor de predicción TopPred.

65 Figura 2. Detección de transcritos de TM9SF4/TUCAP-1 y caracterización de anticuerpos contra TUCAP-1.

(A) Análisis mediante RT-PCR de TUCAP-1 (panel superior) y GAPDH (panel inferior) en cinco líneas celulares de melanoma metastásico (MM1-5) y cinco de melanoma primario (PM1-5) recientemente establecidas *in vitro* a partir de lesión metastásica, y células de sangre periférica de dos donantes diferentes (PBL1-2); M marcador de tamaño.

5 (B) Inmunotransferencias de tipo Western de 6-histidina o TUCAP-1 en el péptido TUCAP-1 marcado con seis-histidina usado para inmunizar ratones y en lisados bacterianos sin inducir. Se cargaron cantidades iguales de proteína purificada y lisado bacteriano en geles reductores y se sometieron a inmunotransferencia con el anticuerpo contra 6-His o antisueros de ratones contra TUCAP-1. Las proteínas se visualizaron usando anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se revelaron con el sistema ECL (Pierce).

10 (C) Inmunotransferencia de tipo Western para GFP-TUCAP-1 y GAPDH sobre fracciones solubles en Triton (carril 1) e insolubles en Triton (carril 2) de células MM1 transfectadas con GFP-TUCAP-1 (GFP-Tuc), y fracciones solubles e insolubles en Triton de células MM1 no transfectadas (carriles 3-4). M marcador de tamaño. Las proteínas se visualizaron usando anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se revelaron con ECL (Pierce). Como marcadores de peso molecular se usaron patrones preteñidos Rainbow™ (Amersham RU).

Figura 3. Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de TUCAP-1.

20 Inmunotransferencia de tipo Western para la detección de TUCAP-1 sobre células MM2 transfectadas con GFP-Tuc, cuatro líneas celulares de melanoma metastásico (MM2-5) y fibroblastos de piel humanos (HSC) CCD-1064SK. La cantidad de carga se controló mediante la inmunodetección de actina. Las proteínas se visualizaron usando anticuerpos secundarios conjugados con HRP y el sistema DAB (DAKO, Dinamarca) como cromógeno. Se usaron patrones preteñidos Rainbow™ (AmershamUK) como marcadores de peso molecular.

25 Figura 4. Análisis inmunocitoquímico e inmunohistoquímico de TUCAP-1. La figura 4A es igual en blanco y negro.

Análisis inmunocitoquímico de suero de ratones preinmunes de (A) células MM2; (B) linfocitos de sangre periférica; (C) macrófagos diferenciados *in vitro*.

30 Análisis inmunocitoquímico para TUCAP-1 de: (D) células M2; (E) células de sangre periférica; (F) macrófagos.

Análisis inmunohistoquímico de tejidos de melanoma maligno teñidos con: (G) suero de ratón preinmune; (H) suero inmune frente a TUCAP-1; y (I) anti-GP100.

35 Análisis inmunohistoquímico de piel sana teñida con: (J) suero de ratón preinmune, (K) Suero inmune frente a TUCAP-1, y (L) anticuerpo anti-ezrina. Aumento 10X.

Figura 5. Localización subcelular de TUCAP-1/ - I. La figura 5A es igual en blanco y negro.

40 (A) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de fracciones subcelulares de inmunoprecipitados de TUCAP-1 a partir de lisados de MM2 totales. M marcador de tamaño, TE extractos totales.

(B) Análisis de tinción doble mediante inmunofluorescencia (IF) de TUCAP-1 (verde) y Rab5 (rojo).

45 (C) Análisis de tinción doble mediante IF de TUCAP-1 (verde) y Lamp-1 (rojo).

(D) Análisis de tinción doble mediante IF de TUCAP-1 (verde) y mitocondria teñida con Mitotracker (rojo). Las áreas amarillas/naranjas indican colocalización. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Aumento 100X.

50 Figura 6. Localización subcelular de TUCAP-1 - II. La figura 6A es igual en blanco y negro. Análisis de tinción doble mediante inmunofluorescencia (IF) de TUCAP-1 (verde) y EEA1 (rojo) en células MM2. Las áreas amarillas/naranjas indican colocalización. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Aumento 100X.

Figura 7. Detección de TUCAP-1 en células caníbales. La figura 7A es igual en blanco y negro.

55 (A) Detección y localización de TUCAP-1 en células de melanoma metastásico MM1 cocultivadas con linfocitos vivos. Análisis mediante IVM de TUCAP-1 (verde). La imagen resalta que TUCAP-1 es detectable exclusivamente en células de melanoma.

60 (B) Análisis de doble fluorescencia de TUCAP-1 (verde) y EEA-1 (rojo) en células de melanoma metastásico MM1 cocultivadas con linfocitos vivos. Las áreas amarillas/naranjas indican colocalización. Los núcleos se tiñen con Hoechst 33258.

Figura 8. Análisis mediante FACS de la expresión de TUCAP-1.

65 Análisis mediante FACS de la expresión de TUCAP-1 en células MM2 no transfectadas, ARNip y ARNip de TUCAP-

1 (ARNip de TM9SF4) desordenados en células MM2 transfectadas 48 horas después de la transfección.

Figura 9. Análisis funcional de TM9SF4/TUCAP-1.

5 (A) Análisis mediante FACS de la actividad fagocítica de ARNip (SC-ARNip) o ARNip de TUCAP-1 (ARNip de TM9SF4) desordenados en células MM2 transfectadas. Gris: células control no teñidas; rojo: células transfectadas con ARNip desordenado control negativo; verde: células transfectadas con ARNip de TM9SF4.

10 (B) Análisis mediante FACS de la actividad caníbal de SC-ARNip o ARNip de TM9SF4 en células MM2 transfectadas incubadas 18 horas con linfocitos teñidos con DHR123. Gris: células control no teñidas; rojo: células transfectadas con SC-ARNip; verde: células transfectadas con ARNip de TM9SF4. Para excluir linfocitos teñidos con DHR123 no ingeridos con células de melanoma, exclusivamente se evaluó la emisión de fluorescencia de células de melanoma.

15 (C) Análisis mediante FACS de tinción LysoTracker DND-26 de células MM2 transfectadas con SC-ARNip o ARNip de TM9SF4. Gris: células control no teñidas; rojo: células transfectadas con SC-ARNip; verde: células transfectadas con ARNip de TM9SF4.

20 Figura. 10. La sobreexpresión de TUCAP-1 potencia la invasión celular a través de Matrigel. La figura 10A es igual en blanco y negro. Micrografía de fase de células de melanoma WM743 que invaden en comparación con células de melanoma TUCAP-1 WM743 (TWM) de longitud completa marcadas con GFP. Las células que invaden se fijaron en formaldehído y se tiñeron con violeta cristal. La imagen muestra claramente que el número de células que invaden era significativamente mayor para TWM, con una media de 25 células para no transfectadas frente a una media de 132 células para TWM transfectadas con TUCAP-1.

## 25 Descripción de la invención

TUCAP-1/TM9SF4 (nombre completo oficial según el comité oficial de nomenclatura HUGO: miembro 4 de la superfamilia de proteínas transmembrana 9) pertenece a la superfamilia de proteínas transmembrana 9 (TM9SF), una familia de proteínas altamente conservada caracterizada por la presencia de un gran dominio N-terminal extracelular variable y de nueve a diez dominios transmembrana supuestos. Sin embargo, nunca se ha descrito la función y la localización de TM9SF4 en células humanas. En esta divulgación, se localiza la expresión de proteína y se proporcionan aplicaciones útiles y novedosas para esta proteína. Esta divulgación identifica la proteína como una oncoproteína novedosa y muestra que la proteína se expresa en células tumorales malignas mientras que es indetectable en una variedad de células y tejidos sanos. Esta divulgación también muestra la estructura de la proteína y por analogía con otras proteínas muestra que la proteína puede estar implicada en la regulación del pH de vesículas intracelulares. A lo largo de esta divulgación se nombra a la proteína TUCAP-1 y el gen que codifica para la proteína por consiguiente se nombra *tucap-1*.

40 La tabla 1 a continuación muestra los parámetros fisicoquímicos de la proteína TUCAP-1

Cálculo mediante ProtParam de parámetros fisicoquímicos de Tucap-1:	
Número de aminoácidos:	625
Peso molecular:	72541,3
pl teórico:	6,22
Coeficientes de extinción:	132880 Abs al 0,1% (=1 g/l) 1,832, asumiendo que TODOS los residuos de Cys aparecen como medias cistinas
	132130 Abs al 0,1% (=1 g/l) 1,821, asumiendo que NINGÚN residuo de Cys aparece como media cistina
Semivida estimada:	30 horas (mamíferos)

45 El análisis de hidroterapia de TUCAP-I a través del servidor de predicción TopPred reveló una porción amino-terminal mayormente hidrófila, que se extiende hasta el aminoácido 262, mientras que la porción restante de la proteína es extremadamente hidrófoba y contiene nueve dominios transmembrana potenciales (figura 1A). Basándose en esta estructura predicha puede plantearse una hipótesis con alta confianza de que TUCAP-I es una proteína de membrana integral tal como se muestra en la figura 1B. El hallazgo de que existe una homología bastante alta entre TUCAP-I y PHG1 (el 45% que aumenta hasta el 63% si se considera la alineación positiva del programa para proteínas Blast de NCBI) condujo a una hipótesis novedosa de que TUCAP-I puede tener un papel en la actividad caníbal de células de melanoma metastásico humanas.

50 Existen polinucleótidos descritos que corresponden o son complementarios a todo o parte del gen *tucap-1*, los ARNm, y/o secuencias codificantes, preferiblemente en forma aislada, incluyendo polinucleótidos que codifican para proteínas TUCAP-1 y fragmentos de los mismos, ADN, ARN, híbrido de ADN/ARN, y moléculas relacionadas,

oligonucleótidos complementarios al gen *tucap-1* o secuencias de ARNm o partes de los mismos, y polinucleótidos o oligonucleótidos que se hibridan con los genes TUCAP-1, los ARNm, o a polinucleótidos que codifican para TUCAP-1.

5 Un "anticuerpo" que es una molécula de anticuerpo completa o fragmento de la misma que reconoce (o puede unirse a) "secuencias específicas" de la proteína TUCAP-1, que es su antígeno se define en las reivindicaciones adjuntas. Anticuerpo puede ser o bien un anticuerpo policlonal o bien un anticuerpo monoclonal. En esta realización, la proteína TUCAP-1 es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, y las secuencias específicas son polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que contiene delección, sustitución o adición  
10 de uno o más aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma. El anticuerpo abarca mutantes de anticuerpo. Un "mutante de anticuerpo" es un mutante en el que uno o más residuos de aminoácido en el anticuerpo se han modificado con respecto al original.

15 Los inhibidores de TUCAP-1 pueden ser secuencias de polinucleótido que son sustancialmente complementarias a la secuencia de SEQ ID NO: 2 o parte de la misma, y secuencias de oligonucleótido sustancialmente complementarias a un fragmento de SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se dan a conocer por el documento EP 1104771.

20 Métodos para el tratamiento del cáncer en un paciente humano comprenden la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de TUCAP-1 seleccionado de un ácido nucleico aislado que es sustancialmente complementario a SEQ ID NO: 2 o parte de la misma, o complementario al ARNm de TM9SF4, para la inhibición del carácter fagocítico de una célula tumoral. Anticuerpos y fragmentos que se unen específicamente a la proteína TUCAP-1 pueden usarse para tratar cánceres. La invención  
25 incluye el uso de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que están fusionados a otros restos que pueden tener un efecto citotóxico sobre el cáncer.

Otra realización de esta invención son líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales frente a proteína TUCAP-1 o fragmentos de la misma.

30 Pueden proporcionarse moléculas de ADN o ARN recombinante que contienen secuencia de TUCAP-1 de longitud completa de tipo natural o mutada, o mutantes de delección de TUCAP-1, incluyendo pero sin limitarse a fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, YAC, BAC, así como diversos vectores de expresión virales y no virales bien conocidos en la técnica, y células transformadas o transfectadas con tales moléculas de ADN o ARN recombinantes.  
35 Usando estos vectores de expresión, preferiblemente puede expresarse TUCAP-1 en varias líneas celulares de tumor maligno. Se prefieren sistemas de huésped-vector que son útiles para la producción de una proteína TUCAP-1 o fragmento de la misma. Tales sistemas de huésped-vector pueden emplearse: i) para estudiar las propiedades funcionales de TUCAP-1 y mutaciones de TUCAP-1; ii) como modelo para desarrollar un protocolo de terapia génica basándose en la utilización de vectores de silenciamiento de TUCAP-1 y vectores que expresan mutantes de  
40 TUCAP-1.

Esta invención proporciona una herramienta única para medir, estudiar y detectar TUCAP-1, como marcador de malignidad de muchos tipos de cáncer tal como se define por las reivindicaciones adjuntas. Además, esta invención introduce una herramienta nueva para oncólogos clínicos en el manejo y el seguimiento de pacientes con cáncer.  
45 Además, péptidos de otras moléculas que pueden interferir en la expresión o actuar como agentes de bloqueo de TUCAP-1 están dentro del alcance de esta invención como compuestos antineoplásicos.

Aun otra realización preferida de esta invención es un kit para detectar TUCAP-1 a partir de muestras de tejido y fluidos corporales de pacientes con tumores como una herramienta de diagnóstico y/o pronóstico tal como un kit de  
50 detección, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas. Tal kit comprende: a) anticuerpos anti-TUCAP-1; b) un control positivo que consiste en la proteína TUCAP-1 purificada, y los tampones necesarios.

La invención se describe ahora por medio de ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

## 55 Ejemplo

### EJEMPLO 1

60 Los transcritos de *Tucap-1* y proteína TUCAP-1 pueden detectarse en células de melanoma maligno humano, pero no en células de melanoma primario, en células mononucleares de sangre periférica o en células cutáneas sanas.

Cultivo celular. Se derivaron líneas celulares humanas de melanoma primario y metastásico, respectivamente, de lesiones de tumor primario o metastásico de pacientes sometidos a resección quirúrgica en el Istituto Nazionale dei Tumori, Milán, Italia. Todas las células empleadas en el estudio actual se denominaron PM (melanoma primario) o  
65 MM (melanoma metastásico), seguido por un número progresivo. Se purificaron células mononucleares de sangre

periférica (PBMC) humanas mediante gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) de capas leucocíticas de donantes sanos. Se separaron monocitos de PBMC usando microperlas Miltenyi marcadas con CD14 según las indicaciones del fabricante y se dejó que se diferenciaron durante 2 semanas a 37°C en RPMI 1640 más FCS al 15%. Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica (PBL) restantes tras la ablación de monocitos mediada por perlas con CD 14. Se sembraron todas las células en RPMI 1640 complementado con penicilina 100 UI/ml, estreptomina 100 Ag/ml, FCS al 10% en un entorno de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. (Todos los reactivos se adquirieron de Cambrex).

Análisis mediante PCR. Se evaluó la expresión de transcritos de *Tucap-1* mediante rt-PCR en diversas líneas celulares de melanoma primario y metastásico obtenidas de melanomas de pacientes sometidos a resección quirúrgica en el Instituto Nazionale Tumori, Milán, en comparación con linfocitos de sangre periférica (PBL). Se obtuvo ARN total de las células mediante el método RNAzol (Invitrogen) y se usaron moldes de ARN para la amplificación mediante RT-PCR. Los cebadores para la detección de TUCAP-1 fueron:

tgtgtgaacaagcgccttc (SEQ ID NO: 3), y

atgaggtggacgtagtagt (SEQ ID NO: 4).

Estos cebadores amplifican un fragmento de 349 pares de bases.

Los cebadores usados para dirigir la síntesis del dominio N-terminal marcado con cola de His de TUCAP-1 fueron:

gaattcatgtgtgaacaagcgcctt (SEQ ID NO: 5) y

gtcgacagaaaaccagtggatctg (SEQ ID NO: 6).

Los cebadores para detectar GAPDH fueron:

ccatggagaaggctgggg (SEQ ID NO: 7) y

caaagttgcatggatgacc (SEQ ID NO: 8).

Clonación de TUCAP 1 y expresión de proteína de fusión de TUCAP 1 en células de melanoma humano:

Se clonaron productos de PCR en un vector pTopo (Invitrogen) y después se escindieron con el par de enzimas de restricción apropiado (EcoRI, Sall) para adquirir un único fragmento que posteriormente se ligó en el vector pTrcHis2 (Invitrogen). Se purificó la proteína recombinante expresada empleando resina de Ni-NTA-agarosa (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se usó para inmunizar ratones.

Los cebadores que se usaron para dirigir TUCAP-1 de longitud completa marcada con GFP fueron:

gaattcatgtgtgaacaagcgc (SEQ ID NO: 9), y

gtcgatgtctatcttcacagcata (SEQ ID NO: 10)

Se clonaron productos de PCR en un vector pTopo (Invitrogen) y después se escindieron con el par de enzimas de restricción apropiado (EcoRI-Sall) y se ligaron para adquirir un único fragmento que posteriormente se ligó en el vector pEGFPN1 (Clontech) en los sitios de EcoRI y Sall para producir la proteína de fusión GFP-TUCAP-1. Se transfectoron plásmidos que codificaban para la proteína de fusión GFP-TUCAP-1 en células MM1 y MM2 usando el kit de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante, obteniendo así GFP-TUCAP-1.

Células MM1 o MM2 (GFP-Tuc). Se evaluó el porcentaje de células transfectadas mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia.

Inmunotransferencia de tipo Western e inmunoprecipitación

Se resuspendieron lisados bacterianos, lisados de célula de melanoma completos y fibroblastos cutáneos sanos CCD-1064SK (SantaCruz) en tampón de muestra de SDS, se desnaturalizaron mediante ebullición, se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se detectaron proteína marcada con cola de 6xHis, GFP, TUCAP-1 y GAPDH, respectivamente, con AcM anti-6His (Sigma), anticuerpo anti-GFP (clon 1E4 MBL), suero de ratón anti-TUCAP-1 y anticuerpo anti-GAPDH (SantaCruz). Se inmunoprecipitaron proteínas TUCAP-1 durante la noche a 4°C en presencia de perlas de proteína A+G-Sepharose (Pierce) a partir de lisados celulares previamente aclarados, usando anticuerpo AcP de conejo anti-TUCAP-1. Se usó suero preinmunitario de conejo como control negativo. Se detectó actina con AcM anti-actina (Sigma).

Con el fin de caracterizar el producto génico de *tucap-1*, se clonó ADNc derivado de células MM1 en vectores de

expresión bacterianos para obtener los primeros 265 aminoácidos de TUCAP-1 fusionados con una cola N-terminal de 6 histidinas (6H-Nt-TUCAP 1) (SEQ ID NO: 11). El análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de proteína recombinante purificada dio como resultado un producto de traducción de aproximadamente 30 kDa ausente en lisados completos bacterianos de control (control negativo). Por tanto, se empleó péptido recombinante de TUCAP-1 marcado con cola de His como inmunógeno para producir anticuerpos anti-TUCAP-1 en ratones. Se determinó la especificidad del antisuero contra TUCAP-1 mediante el análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de 6H-Nt-TUCAP-1 sometido a inmunotransferencia con antisueros de ratón anti-6His y TUCAP-1 (figura 2B). Se analizó adicionalmente antisuero de ratón contra TUCAP-1 mediante inmunotransferencia de tipo Western con fracciones solubles en Triton e insolubles en Triton de células MM1 transfectadas o no transfectadas con una TUCAP-1 de longitud completa marcada con GFP (GFP-TUCAP-1). El anticuerpo anti-GFP reveló un único producto de traducción en el intervalo de 100 kDa, mientras que los anticuerpos anti-TUCAP-1 reconocieron TUCAP-1 tanto marcada con GFP como endógena que correspondía a una proteína de 70 kDa detectable en ambas líneas celulares (figura 2C). Resulta interesante que TUCAP-1 estaba más representada en las fracciones insolubles en Triton (fracción enriquecida en proteínas del citoesqueleto, negativa para GAPDH), respaldando así los modelos provisionales que proponen TUCAP-1 como proteína transmembrana. Para respaldar adicionalmente los resultados de PCR, se transfirieron los anticuerpos anti-TUCAP-1 en extractos celulares de cuatro células de melanoma metastásico (MM2-MM5), anteriormente analizadas para determinar su comportamiento caníbal en comparación con fibroblastos cutáneos sanos (HSC) y células MM2 transfectadas con GFP-TUCAP-1, como control. TUCAP-1 pudo detectarse exclusivamente en células de melanoma, mientras que era indetectable en células cutáneas (figura 3).

## EJEMPLO 2

La inmunohistoquímica muestra TUCAP-1 exclusivamente en células de melanoma.

Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. A partir de la inmunocitoquímica, células de melanoma y macrófagos, cultivadas sobre portaobjetos de cámara de vidrio (Falcon), y PBL, sometidos a citocentrifugación sobre portaobjetos de vidrio, se fijaron con metanol al 80% durante 10 minutos a 4°C y se tiñeron para detectar TUCAP-1, suero de ratón contra TUCAP-1 o suero de control preinmunitario. Se inmunotiñeron melanoma maligno y tejido cutáneo normal correspondiente de portaobjetos de matriz de Biomax (Biomax) con suero preinmunitario, para detectar antisuero de ratón anti-TUCAP-1. También se tiñó melanoma para detectar anti-gp100 (Immunotech) mientras que también se tiñó piel normal para detectar anticuerpo anti-ezrina (Sigma). Se visualizaron las proteínas usando el método de peroxidasa-antiperoxidasa en una única tinción (Dako) y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer.

La figura 4 A-C muestra que las líneas celulares MM2 (A), los linfocitos de sangre periférica (B) y los macrófagos diferenciados *in vitro* (C), eran negativos para suero preinmunitario de ratón. De manera que concuerda con los resultados de PCR, las células cultivadas con melanoma maligno mostraron una clara tinción positiva para TUCAP-1 (figura 4 D) mientras que PBL (figura 4E) y macrófagos (figura 4 F) fueron negativos para la tinción para TUCAP1. El análisis inmunohistoquímico de tejidos de melanoma maligno en comparación con piel sana sugirió que TUCAP-1 sólo era detectable en tejidos de melanoma (figura 4 H) mientras que era indetectable en piel sana (4K). Como marcadores de control positivo para melanoma y piel normal, se usaron respectivamente GP100 (figura 4I) y ezrina (figura 4L). La tinción con suero de ratón preinmunitario siempre fue negativa en ambos tejidos (figura 4G, 4J). Estos resultados proporcionan una clara evidencia de que TUCAP-1 era detectable exclusivamente en células de melanoma y por tanto respaldan los resultados del ejemplo 1.

## EJEMPLO 3

Ubicación subcelular de TUCAP-1.

Además se realizaron experimentos para analizar la ubicación intracelular de TUCAP 1.

Fraccionamiento de compartimentos celulares. Se recogieron las células y se procesaron según el protocolo del kit de membrana plasmática Qproteome (Quiagen) con el fin de obtener fracciones no desnaturalizadas de compartimentos celulares que correspondían a citosol y membranas plasmáticas purificadas. Después se precipitaron estas últimas fracciones con acetona y se resuspendieron en tampón de inmunoprecipitación B (SDS al 0,1%, NP40 al 1%, colato de sodio al 0,5%) con el fin de someterse a inmunoprecipitación con anticuerpo de conejo anti-TUCAP-1. Se privó sedimento residual del fraccionamiento de compartimentos celulares, que contenía células intactas y orgánulos, de estas primeras mediante centrifugación y se sometió a extracción con Triton X-100 con el fin de obtener fracciones solubles e insolubles que se inmunoprecipitaron con anticuerpo de conejo anti-TUCAP-1. Tras la electroforesis de muestras, se sometió la nitrocelulosa a transferencia con anticuerpo de ratón anti-TUCAP-1.

Análisis de inmunofluorescencia. Se sembraron células MM2 sobre cubreobjetos de vidrio colocados en placas Petri de 60 mm. Se fijaron las células con paraformaldehído al 2% y se permeabilizaron (Triton X-100 (al 0,1%)) durante 24 horas. Para la tinción doble de TUCAP 1 y Rab5, se marcaron las células con suero de ratón anti-TUCAP-1 y anticuerpo de conejo anti-Rab5 (SantaCruz) y se revelaron respectivamente con IgG anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 488 e IgG anti-conejo conjugada con Alexa Fluor 594 (Molecular Probes). Para la detección de TUCAP-1 y Lamp-1, se marcaron las células con AcP de conejo anti-TUCAP-1 y AcM de ratón anti-Lamp-1, (BD Pharmingen)



respectivamente, se tiñeron con IgG anti-conejo conjugada con Alexa Fluor 594 e IgG anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 488. Se detectaron TUCAP-1 y mitocondrias mediante tinción de TUCAP-1 con AcP de ratón anti-TUCAP-1 y se marcaron con IgG anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 488, mientras que las mitocondrias se marcaron con rojo de Mitotracker (Invitrogen). Después de los lavados, se montaron todas las muestras con glicerol:PBS (2:1) y se observaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM 2500. Se grabaron las imágenes con una cámara digital Spot Insight (Delta Sistemi) equipada con sistema de análisis de imágenes IAS 8.2 (Delta Sistemi).

Se inmunoprecipitaron lisados de células completas MM2 con anticuerpos anti-TUCAP-1 y se separaron diversas fracciones subcelulares y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western. Los resultados revelaron que TUCAP-1 se recuperaba principalmente en fracciones enriquecidas con orgánulos celulares, mientras que era indetectable en fracciones sistólicas y de membrana plasmática (figura 5A). Con el fin de identificar la ubicación subcelular de TUCAP-1, se sometieron células MM2 a tinción doble para detectar TUCAP-1, y o bien para detectar los marcadores endosómicos tempranos Rab5, o bien para detectar el componente de endosomas tardíos y lisosomas Lamp-1, o bien el marcador mitocondriano Mitotracker™. El análisis mediante microscopía de fluorescencia mostró que TUCAP-1 se ubicaba conjuntamente tanto con Rab5 (figura 5B) como con EEA-1 (figura 6 y figura 7B), mientras que no se ubicó conjuntamente con Lamp-1 (figura 5C), Mitotracker™ (figura 5D) ni núcleos teñidos con Hoechst.

Además, la figura 7 muestra la fluorescencia de tinción doble con las mismas células cocultivadas con linfocitos vivos. TUCAP-1 es detectable exclusivamente sobre la superficie de células de melanoma, mientras que los linfocitos quedan completamente sin teñir (figura 7A). De nuevo, TUCAP-1 se ubica conjuntamente con el marcador de endosoma primario EEA-1 (figura 7B) confirmando la expresión de esta proteína en endosomas tempranos.

#### EJEMPLO 4

Análisis funcional de TUCAP-1.

El silenciamiento de *Tucap-1* inhibe el comportamiento fagocitario.

Se evaluó el papel de la proteína TUCAP-1 en células de melanoma metastásico humano inhibiendo su expresión mediante silenciamiento de *Tucap-1*.

Se usaron los siguientes dúplex de iARN StealthR (Invitrogen) para el silenciamiento de *tucap-1*: gagugagcuccagauccacugguuu (SEQ ID NO: 13), y

aaaccaguggaucuggagcucacuc (SEQ ID NO: 14), y se aparearon según las instrucciones del fabricante. Como control negativo se usaron dúplex GC en medio de control negativo de iARN Stealth (Invitrogen). Se transfectaron células de melanoma usando reactivo Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En resumen, el día antes de la transfección, se sembraron células de melanoma en placas de seis pocillos (1X10<sup>5</sup> por pocillo) y, después de 24 horas, se transfectaron las células con 30 pmol de ARNip por pocillo. 48 horas después de la transfección, se analizaron las células para determinar la expresión de TUCAP-1 mediante análisis mediante FACS.

Se transfectaron tres líneas celulares metastásicas fagocíticas diferentes con ARN de interferencia pequeño frente a *Tucap-1* (ARNip de *Tucap-1*) o se transfectaron con un oligómero de ARNip no relevante (SC-ARNip). La figura 8 muestra el análisis mediante FACS de la expresión de TUCAP-1 con células MM2 sin transfectar y células MM2 transfectadas con ARNip desordenado o ARNip de TUCAP-1 48 horas después de la transfección. Se obtuvieron resultados similares en células MM3 desordenadas y silenciadas con respecto a TUCAP-1 (no mostrado). Esto confirmó un silenciamiento eficaz de TUCAP-1.

Para evaluar la actividad fagocítica de estas células, en primer lugar se midió la capacidad de líneas celulares de melanoma sin transfectar, transfectadas con SC-ARNip o silenciadas con respecto a *Tucap-1* para ingerir células de levadura teñidas o linfocitos vivos. 48 horas después de la transfección, se incubaron células de melanoma MM2 y MM3 transfectadas con SC-ARNip o ARNip de TUCAP-1 a 37°C con levaduras de *Saccharomyces* teñidas con FITC, FITC (1:60), o linfocitos vivos teñidos con dihidrorrodamina 123 (DHR123) 10 uMol (Molecular Probes) (1:10). Se midió la fagocitosis/canibalismo después de 4 horas eliminando mediante lavado el exceso de linfocitos o células de levadura con PBS y añadiendo una disolución de PBS que contenía tripsina (1,5 g/l), EDTA (0,44 g/l). Después de los lavados, se recogieron las células de melanoma y se analizaron con un citómetro equipado con un láser de argón a 488 nm. Se adquirieron al menos 10.000 acontecimientos y se analizaron mediante un ordenador Macintosh usando el software CellQuest (Becton Dickinson). Se consideró que las células de melanoma que aparecían con fluorescencia verde eran fagocíticas/caníbalas. Los resultados mostraron que el silenciamiento de TUCAP-1 inhibió notablemente la actividad tanto fagocítica como caníbal de células de melanoma (figura 9A, 9B, tabla 1), demostrando que TUCAP-1 desempeña un papel fundamental en el comportamiento caníbal de melanomas metastásicos humanos y por tanto la proteína puede usarse como marcador de malignidad.

Tabla 2. Papel de TUCAP-1 en fagocitosis/canibalismo.

Actividad fagocítica/canibal de células de melanoma metastásico MM2 y MM3 transfectadas con ARNip desordenado (SC-ARNip) y silenciadas con respecto a Tucap-1 (ARNip de Tucap-1) frente a levaduras teñidas con FITC y linfocitos vivos teñidos con DHR123. La actividad fagocítica se expresó como % de células fagocíticas. Los números son la media  $\pm$  d.e. de 5 experimentos diferentes.

	Levaduras		Linfocitos vivos	
	SC-ARNip	ARNip de Tucap-1	SC-ARNip	ARNip de Tucap-1
MM2	37 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	45 $\pm$ 5	17 $\pm$ 9
MM3	43 $\pm$ 14	14 $\pm$ 12	40 $\pm$ 9	9 $\pm$ 7

EJEMPLO 5

5 TUCAP-1 tiene un papel en la regulación de la acidificación de vesículas endosómicas.

Se tiñeron células MM2 y MM3 transfectadas con ARNip desordenado y silenciadas con respecto a TUCAP-1 con sonda LysoTracker 1  $\mu$ M (Molecular Probes) durante 30 minutos a 37°C y se analizaron inmediatamente mediante un citómetro. Se llevaron a cabo comparaciones entre diferentes líneas celulares de melanoma mediante software CellQuest usando la mediana de los valores de histogramas de intensidad de fluorescencia.

10 Basándose en el resultado de que TUCAP-1 se ubica en endosomas que portan Rab5 (véase el ejemplo 3), se sometió a prueba la hipótesis de que la proteína TUCAP-1 puede tener un papel en la regulación del pH de compartimentos fago/endosómicos de células tumorales malignas. Para verificar esta hipótesis, se tiñeron células transfectadas con SC-iARN de control y ARNip de TUCAP-1 con la sonda acidotrópica LysoTracker verde y se analizaron mediante simetría de flujo. El silenciamiento del gen *tucap-1* indujo la aparición de vesículas menos ácidas dentro de células de melanoma, en comparación con células control transfectadas con SC-ARN (figura 9C). Estos experimentos respaldan la hipótesis de que TUCAP-1 tiene un papel en la regulación de la acidificación de vesículas internas, tales como endosomas tempranos.

20 EJEMPLO 6

Implicación de TUCAP-1 en fases tempranas del proceso metastático.

25 Experimentos en curso basados en el uso de células que sobreexpresan TUCAP-1 sugieren que esta proteína está implicada en la capacidad de invasión de células tumorales durante fases tempranas del proceso metastático. Se somete a ensayo la capacidad de invasión celular de estas células usando cámaras de invasión Matrigel (Becton-Dickenson, Bedford, MA, EE.UU.). En resumen, se resuspendieron células de melanoma WM743 sin transfectar o WW743 transfectadas con TUCAP-1 de longitud completa marcada con GFP (TWM) en medio libre de suero y se cargaron en la cámara superior, mientras que en la cámara inferior se colocó medio con adición de FCS al 10% como agente quimiotáctico. Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada y se dejó que migraran a través de la cámara de quimiotaxis durante 48 horas. Después de la incubación, se retiraron completamente las células que quedaban en la superficie superior usando un portador de algodón. Se tiñeron las células que migraron a la parte inferior de la cámara de quimiotaxis con violeta cristal. Se contaron las células invasoras microscópicamente (40) en cuatro campos diferentes por filtro. La figura 10 muestra el lado inferior de la membrana Transwell, indicando claramente que el número de células invasoras era significativamente superior para TWM, con una media de 25 células para células sin transfectar frente a una media de 132 células para células TWM transfectadas con TUCAP 1.

40 EJEMPLO 7

Implicación de TUCAP-1 en la resistencia a cisplatino de células de melanoma.

45 Diversas publicaciones muestran el papel de proteínas implicadas en el tráfico de iones y el papel del compartimento endo-lisosómico en el secuestro, inactivación y extrusión de fármacos como mecanismos de resistencia a fármacos. La expresión de TUCAP 1 en endosomas tempranos y su implicación en la regulación del pH de vesículas endosómicas (tal como se mostró en los ejemplos anteriores) condujo a plantear la hipótesis de un papel para esta proteína en la resistencia a fármacos de células cancerosas. Para demostrarlo, se trataron previamente células de melanoma MM2, que expresaban TUCAP-1 en altas cantidades, con ARNip desordenado (SC-ARNip) o frente a *Tucap-1* durante 48 horas (tal como se mostró en los ejemplos anteriores), y después de la transfección se trataron las células con cisplatino 2  $\mu$ M. 48 horas después se evaluó la citotoxicidad inducida por cisplatino mediante análisis mediante FACS de apoptosis temprana (positivo individual para anexina V) y tardía (positivo doble para PI/anexina V). El silenciamiento de *Tucap-1* aumentó notablemente los efectos citotóxicos de cisplatino en comparación con células WM743 tratadas con ARNip desordenado que se comportaron como las células control sin transfectar. Con una media del 63% de células vivas en las células transfectadas control frente a una media del 37% en células

silenciadas con respecto a TUCAP-1.

Este conjunto de experimentos demuestra que TUCAP-1 está implicada en la resistencia a fármacos de células que sobreexpresan TUCAP-1 y que el silenciamiento de *tucap-1* es un método prometedor de inhibición del carácter fagocitario de células tumorales.

Basándose en los resultados mostrados en los ejemplos anteriores, la presente divulgación también proporciona métodos altamente sensibles y específicos para la detección de melanoma y varios otros tumores caracterizados por un comportamiento fagocitario descrito, es decir, cáncer de mama, carcinoma de pulmón, cáncer de vejiga, meduloblastoma y adenocarcinoma gástrico. Además, esta divulgación proporciona medios para distinguir lesiones cancerosas malignas de benignas mostrando que TUCAP-1 se expresa exclusivamente en tumores malignos. Los métodos para la detección de cáncer comprenden la evaluación de una muestra biológica de una supuesta lesión cancerosa, normalmente mediante hibridación *in situ*, rt-PC, o métodos inmunoenzimáticos.

## EJEMPLO 8

Anticuerpos policlonales y monoclonales frente a TUCAP-1.

Basándose en los ejemplos anteriores, los anticuerpos policlonales (AcP) y monoclonales (AcM) específicos para TUCAP-1 serán útiles para diversos fines, incluyendo por ejemplo el diagnóstico para determinar la malignidad de un tumor, y el tratamiento de cáncer.

Con el fin de producir anticuerpos policlonales, se clonó ADNc de células MM1 en vectores de expresión bacterianos para obtener los aminoácidos 18-282 de TUCAP-1 fusionados con una cola N-terminal de 6 histidinas (SEQ ID NO: 11). Se usó péptido recombinante purificado para producir anticuerpos anti-TUCAP-1 en ratones. Los anticuerpos anti-TUCAP-1 reconocieron el inmunógeno, proteína de longitud completa marcada con GFP como control positivo así como proteína TUCAP-1 endógena.

También se generaron anticuerpos policlonales mediante inmunización de conejos, cabras y burros con un fragmento peptídico purificado que tenía una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 12. Los anticuerpos generados podían reconocer proteína TUCAP-1 humana mediante unión a un fragmento peptídico que consistía en los aminoácidos 221-235 de SEQ ID NO: 1. También se obtienen anticuerpos policlonales mediante inmunización de cabras y burros.

Con el fin de producir anticuerpos monoclonales, se inmunizaron ratones con un fragmento peptídico que tenía la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 o un fragmento de las mismas. Alternativamente se inmunizan ratones con fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 15. Se generaron clones de hibridomas seleccionados usando células del bazo de ratones seleccionados. En resumen, se fusionaron células B derivadas del bazo de ratones inmunizados con una línea de células tumorales de mieloma específicamente seleccionada para la producción de hibridomas. Las células fusionadas derivadas (híbrido) que pueden crecer de manera indefinida en cultivo con la consecuente producción de grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Se realizó la producción de hibridomas según protocolos convencionales. Después de examinar los hibridomas seleccionados, se clonan los hibridomas y se hacen crecer a gran escala para la producción de anticuerpos. Se seleccionan diversos hibridomas positivos para diferentes usos, por ejemplo: a) usos experimentales de laboratorio (inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación, análisis mediante FACS, inmunofluorescencia y análisis inmunohisto- e inmunocitoquímico de tejidos humanos y células cultivadas); b) estudios preclínicos y clínicos, c) herramientas de diagnóstico y pronóstico de tumores, tal como kit de detección. Los anticuerpos monoclonales producidos se unen a epítopos conformacionales o lineales de los aminoácidos 18-282 de la proteína TUCAP-1 de SEQ ID NO: 1 o fragmento peptídico que consiste en los aminoácidos 221-235 o que consiste en los aminoácidos 303-352 de SEQ ID NO: 1. Los anticuerpos también se unen a la proteína TUCAP-1 de origen de ratón, rata, gato, perro y oveja.

Los ejemplos anteriores dan a conocer en detalle realizaciones particulares de la invención. Sin embargo, esto se ha hecho sólo a modo de ejemplo y con fines de ilustración. No se pretende que los ejemplos limiten el alcance de las reivindicaciones adjuntas, que definen la invención.

## Referencias

Bukrinskaya A, Brichacek B, Mann A, Stevenson M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med.* 1998; 188:2113-2125. Caruso RA, Muda AO, Bersiga A, Rigoli L, Inferrera C. Morphological evidence of neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human gastric adenocarcinomas. *Ultrastruct Pathol* 2002; 26:315-21.

Chou, K.C. (2005). "Using amphiphilic pseudo amino acid composition to predict enzyme subfamily classes". *Bioinformatics*, 21, 10-19.

- DeSimone PA, East R, Powell RD. Phagocytic tumor cell activity in oat cell carcinoma of the 6y7y- j - -- ol 1980; 11:535-9.
- 5 Fujii M, Ishii Y, Wakabayashi T, *et al.* Cytologic diagnosis of male breast cancer with nipple discharge.A case report. Acta Cytol 1986; 30:2.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003).
- 10 Kojima S, Sekine H, Fukui I, Ohshima H. Clinical significance of "cannibalism" in urinary cytology of bladder cancer. Acta Cytol 1998; 42:1365-9.
- Kumar PV, Hosseinzadeh M, Bedayat GR. Cytologic findings of medulloblastoma in crush smears. Acta Cytol 2001; 45:542-6.
- 15 Lugini L, Lozupone F, Matarrese P, Funaro C, Luciani F, Malorni W, Rivoltini L, Castelli C, Tinari A, Piris A, Parmiani G, Fais S.Potent phagocytic activity discriminates metastatic and primary human malignant melanomas: a key role of ezrin. Lab Invest. Noviembre de 2003; 83(11):1555-67.
- 20 Lugini L, Matarrese P, Tinari A, Lozupone F, Federici C, Iessi E, Gentile M, Luciani F, Parmiani G, Rivoltini L, Malorni W, Fais S.Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells. Cancer Res. 1 de abril de 2006; 66(7):3629-38.
- B Rost, G Yachdav and J Liu (2004) Server. Nucleic Acids Research 32(edición de servidor Web): W321-W326.
- 25 B Rost (1996) Methods in Enzymology, 266:525-539.
- Shen, H. B. and Chou, K. C (2007) "Hum-mPLoc: an ensemble classifier for large-scale human protein subcellular location prediction by incorporating samples with multiple sites", Biochemical and Biophysical Research Communications. 355(4):1006-11.
- 30 Sloane BF, Dunn JR, Honn KV. Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. Science 1981; 212:1151-3.
- 35 Steinhaus J. Ueber carcinoma-einschlusse. Virchows Arch 1891; 126:533-5.
- Stroebe H. Zur Kenntniss verschiedener cellularer Vorgange und Erscheinungen in Geschwulsten. Beitrage Pathol 1892; 11:1.
- 40 Shen, H. B. and Chou, K. C. (2006). "Ensemble classifier for protein folding pattern recognition". Bioinformatics, 15 de julio; 22(14):1717-22.

**Lista de secuencias**

- 45 <110> HANSABIOMED OÜ
- <120> Nueva molécula asociada a tumores humanos metastásicos, métodos para detectar tanto el gen activado como la proteína y para interferir con la expresión génica
- 50 <130> TUCAP
- <150> Documento 61/062.453
- <151> 25-02-2008
- 55 <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 60 <211> 642
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 65

ES 2 587 055 T3

Met Ala Thr Ala Met Asp Trp Leu Pro Trp Ser Leu Leu Leu Phe Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Met Cys Glu Thr Ser Ala Phe Tyr Val Pro Gly Val Ala Pro Ile  
 20 25 30  
 Asn Phe His Gln Asn Asp Pro Val Glu Ile Lys Ala Val Lys Leu Thr  
 35 40 45  
 Ser Ser Arg Thr Gln Leu Pro Tyr Glu Tyr Tyr Ser Leu Pro Phe Cys  
 50 55 60  
 Gln Pro Ser Lys Ile Thr Tyr Lys Ala Glu Asn Leu Gly Glu Val Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Asp Arg Ile Val Asn Thr Pro Phe Gln Val Leu Met Asn Ser  
 85 90 95  
 Glu Lys Lys Cys Glu Val Leu Cys Ser Gln Ser Asn Lys Pro Val Thr  
 100 105 110  
 Leu Thr Val Glu Gln Ser Arg Leu Val Ala Glu Arg Ile Thr Glu Asp  
 115 120 125  
 Tyr Tyr Val His Leu Ile Ala Asp Asn Leu Pro Val Ala Thr Arg Leu  
 130 135 140  
 Glu Leu Tyr Ser Asn Arg Asp Ser Asp Asp Lys Lys Lys Glu Lys Asp  
 145 150 155 160  
 Val Gln Phe Glu His Gly Tyr Arg Leu Gly Phe Thr Asp Val Asn Lys  
 165 170 175

ES 2 587 055 T3

Ile Tyr Leu His Asn His Leu Ser Phe Ile Leu Tyr Tyr His Arg Glu  
 180 185 190

Asp Met Glu Glu Asp Gln Glu His Thr Tyr Arg Val Val Arg Phe Glu  
 195 200 205

Val Ile Pro Gln Ser Ile Arg Leu Glu Asp Leu Lys Ala Asp Glu Lys  
 210 215 220

Ser Ser Cys Thr Leu Pro Glu Gly Thr Asn Ser Ser Pro Gln Glu Ile  
 225 230 235 240

Asp Pro Thr Lys Glu Asn Gln Leu Tyr Phe Thr Tyr Ser Val His Trp  
 245 250 255

Glu Glu Ser Asp Ile Lys Trp Ala Ser Arg Trp Asp Thr Tyr Leu Thr  
 260 265 270

Met Ser Asp Val Gln Ile His Trp Phe Ser Ile Ile Asn Ser Val Val  
 275 280 285

Val Val Phe Phe Leu Ser Gly Ile Leu Ser Met Ile Ile Ile Arg Thr  
 290 295 300

Leu Arg Lys Asp Ile Ala Asn Tyr Asn Lys Glu Asp Asp Ile Glu Asp  
 305 310 315 320

Thr Met Glu Glu Ser Gly Trp Lys Leu Val His Gly Asp Val Phe Arg  
 325 330 335

Pro Pro Gln Tyr Pro Met Ile Leu Ser Ser Leu Leu Gly Ser Gly Ile  
 340 345 350

Gln Leu Phe Cys Met Ile Leu Ile Val Ile Phe Val Ala Met Leu Gly  
 355 360 365

Met Leu Ser Pro Ser Ser Arg Gly Ala Leu Met Thr Thr Ala Cys Phe  
 370 375 380

Leu Phe Met Phe Met Gly Val Phe Gly Gly Phe Ser Ala Gly Arg Leu  
 385 390 395 400

Tyr Arg Thr Leu Lys Gly His Arg Trp Lys Lys Gly Ala Phe Cys Thr  
 405 410 415

Ala Thr Leu Tyr Pro Gly Val Val Phe Gly Ile Cys Phe Val Leu Asn  
 420 425 430

Cys Phe Ile Trp Gly Lys His Ser Ser Gly Ala Val Pro Phe Pro Thr  
 435 440 445

ES 2 587 055 T3

Met Val Ala Leu Leu Cys Met Trp Phe Gly Ile Ser Leu Pro Leu Val  
 450 455 460

Tyr Leu Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Arg Lys Gln Pro Tyr Asp Asn Pro  
 465 470 475 480

Val Arg Thr Asn Gln Ile Pro Arg Gln Ile Pro Glu Gln Arg Trp Tyr  
 485 490 495

Met Asn Arg Phe Val Gly Ile Leu Met Ala Gly Ile Leu Pro Phe Gly  
 500 505 510

Ala Met Phe Ile Glu Leu Phe Phe Ile Phe Ser Ala Ile Trp Glu Asn  
 515 520 525

Gln Phe Tyr Tyr Leu Phe Gly Phe Leu Phe Leu Val Phe Ile Ile Leu  
 530 535 540

Val Val Ser Cys Ser Gln Ile Ser Ile Val Met Val Tyr Phe Gln Leu  
 545 550 555 560

Cys Ala Glu Asp Tyr Arg Trp Trp Trp Arg Asn Phe Leu Val Ser Gly  
 565 570 575

Gly Ser Ala Phe Tyr Val Leu Val Tyr Ala Ile Phe Tyr Phe Val Asn  
 580 585 590

Lys Leu Asp Ile Val Glu Phe Ile Pro Ser Leu Leu Tyr Phe Gly Tyr  
 595 600 605

Thr Ala Leu Met Val Leu Ser Phe Trp Leu Leu Thr Gly Thr Ile Gly  
 610 615 620

Phe Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Val Arg Lys Ile Tyr Ala Ala Val Lys  
 625 630 635 640

Ile Asp

<210> 2  
 <211> 4028  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ccaagatggc gacggc gatg gtgagtgaag gagactccgg gagcgggagc tggagcgggg 60  
 ccctccgggg tatcccagga tcttccagca ccccatgcct ggccctgagc cacctccggg 120  
 acccctgact caggcctgag ggctacctct gactgggctt gtcttccccg aaatccacct 180  
 ccctggccct gccctgcac tcaggcttgt gaagccccg agttttgggg gaggcgcct 240  
 ttcggaggaa gacctcggct gctgccttcg ccggttccca ttctactttt ggtctccgcc 300

10

ES 2 587 055 T3

cactgattgg ttgccgtggt ctttactgct tttctccctg atgtgtgaaa caagcgcctt 360  
 ctatgtgcct ggggtcgcgc ctatcaactt ccaccagaac gatcccgtag aatcaaggc 420  
 tgtgaagctc accagctctc gaaccagct accttatgaa tactattcac tgccttctg 480  
 ccagcccagc aagataacct acaaggcaga gaatctggga gaggtgctga gaggggaccg 540  
 gattgtcaac acccctttcc aggttctcat gaacagcgag aagaagtgtg aagttctgtg 600  
 cagccagtcc aacaagccag tgaccctgac agtggagcag agccgactcg tggccgagcg 660  
 gatcacagaa gactactacg tccacctcat tgctgacaac ctgcctgtgg ccaccggct 720  
 ggagctctac tccaaccgag acagcgatga caagaagaag gaaaaagatg tgcagtttga 780  
 acacggctac cggctcggct tcacagatgt caacaagatc tacctgcaca accacctctc 840  
 attcatcctt tactatcatc gggaggacat ggaagaggac caggagcaca cgtaccgtgt 900  
 cgtccgcttc gaggtgattc ccagagcat caggctggag gacctcaaag cagatgagaa 960  
 gagttcgtgc actctgcctg agggtagcaa ctctctgccc caagaaattg accccaccaa 1020  
 ggagaatcag ctgtacttca cctactctgt cactgggag gaaagtgata tcaaatgggc 1080  
 ctctcgctgg gacacttacc tgaccatgag tgacgtccag atccactggt tttctatcat 1140  
 taactccgtt gttgtggtct tcttctgtc aggtatcctg agcatgatta tcattcggac 1200  
 cctccggaag gacattgcca actacaaca ggaggatgac attgaagaca ccatggagga 1260  
 gtctgggtgg aagttggtgc acggcgacgt ctcaggccc cccagtagc ccatgatcct 1320  
 cagctccctg ctgggctcag gcattcagct gttctgtatg atcctcatcg tcatcttgt 1380  
 agccatgctt gggatgctgt cgccctccag ccggggagct ctcatgacca cagcctgctt 1440  
 cctcttcatg ttcattgggg tgtttgccg attttctgct ggccgtctgt accgcacttt 1500  
 aaaaggccat cgggtgaaga aaggagcctt ctgtacggca actctgtacc ctggtgtggt 1560  
 ttttggcatc tgcttcgtat tgaattgctt catttgggga aagcactcat caggagcgg 1620  
 gccctttccc accatggtgg ctctgctgtg catgtggttc gggatctccc tgcccctcgt 1680  
 ctacttgggc tactacttct gcttccgaaa gcagccatat gacaaccctg tgcgaccaa 1740  
 ccagattccc cggcagatcc ccgagcagcg gtggtacatg aaccgatttg tgggcatcct 1800  
 catggtggg atcttgcctt tcggcgccat gttcatcgag ctcttcttca tcttcagtgc 1860  
 tatctgggag aatcagttct attacctctt tggcttctg ttccttgttt tcatcatcct 1920  
 ggtggtatcc tgttcaciaa tcagcatcgt catggtgtac ttccagctgt gtgcagagga 1980  
 ttaccgctgg tgggtgagaa atttctagt ctccgggggc tctgcattct acgtcctggt 2040  
 ttatgccatc ttttatttct ttaacaagct ggacatcgtg gagttcatcc cctctctcct 2100  
 ctactttggc tacacggccc tcatggtcct gtccttctgg ctgctaacgg gtaccatcgg 2160  
 cttctatgca gcctacatgt ttgttcgcaa gatctatgct gctgtgaaga tagactgatt 2220  
 ggagtggacc acggccaagc ctgctccgtc ctcggacagg aagccacct gcgtggggga 2280  
 ctgcaggcac gcaaaataaa ataactcctg ctcgtttgga atgtaactcc tggcacagt 2340



ES 2 587 055 T3

ttcctggatc ctggggctgc gtgggggctg ggagggcctg tagataatct tgcgtttttc 2400  
 gtcactttat tccagttctg tgggggatga gtttttttgt gggttgcttt ttcttcagtg 2460  
 ctaagaaagt tccctccaac aggaactctc tgacctgttt attcaggtgt atttctggtt 2520  
 tggatttttt tttccttctt tgttttaaca aatggatcca ggatggataa atccaccgag 2580  
 ataagggttt tggctactgt ctccacctca gttcctcagg gctgttgcc accctatgac 2640  
 taactggaag aggacacgcc agagcttcag tgaggtttcc gacccctctc ctgccccatcc 2700  
 tcaccactga ggccacgaca aagcacagct ccagctcggg cagcaccctc agtgccagcc 2760  
 agcctctgcc agacctctct tccctctctc tccccagcct cctccagggc tgccccaggc 2820  
 agggtttcca gccaggctc ggggtcatct tttcaccagg agcaaacca agtcttagtt 2880  
 gctacaagaa aatcccctgg aagtactggg ggccaggttc cccagacagc aggaattgcc 2940  
 cctgttcaga gcagccggag tttgtcggac cacaaggaag aagagaagag acttgcatg 3000  
 aactgttttt gtgccaagaa accctggacc tggggccaag tatttccca gccaagcatc 3060  
 cacttgtctg tgtctgggaa gggatggcca aggccgctag ggtccttacc cctcaggatc 3120  
 actccccagc ctttctctca ggaggtaccg ctctccaagg tgtgctagca gtgggccctg 3180  
 cccaacttca ggcagaacag ggaggccag agattacaga tcccctctg taagtggcca 3240  
 ggcatttctt cctgcccctc tctggcctct ggggtcatac tcaattcttt agccagcccc 3300  
 atcccctcca cccacacct gagttcttgc ctctccttt tggggacacc caaaactg 3360  
 cttgtgagaa ggaagatgga aggtaagttc tgtcgttctt tcccctatcc ccaggatgg 3420  
 acaagaagcc aacttagaaa gaagggtctc acgtggctgg cctggctcct ccgtagacc 3480  
 ctgttctttt caacctctgc ccaccgtgc atgtcatcac aacatttgc tcttaagtta 3540  
 caagagacca catccacca gggattaggg ttcaagtagc agctgctaac ccttgacca 3600  
 gcccttggg gactcccaac acaagacaaa gctcaggatg ctggtgatgc taggaagatg 3660  
 tccctcccct cactgcccc cattctccca gtggctctac cagcctcacc catcaaacca 3720  
 gtgaatttct caatcttgcc tcacagtgc tgcagcgcca agcggcatcc accaagcatc 3780  
 aagttggaga aaaggaacc caagcagtag agagcgatat tggagtcttt tgttcattca 3840  
 aatcttgat ttttttttt ccctaagaga ttctctttt agggggaatg ggaacggac 3900  
 acctataaa gggttcaaag atcatcaatt tttctgactt tttaaatcat tatcattatt 3960  
 attttaatt aaaaaaatgc ctgtatgctt ttttttggc ggattgtaa taaatatacc 4020  
 attgtcct 4028

<210> 3  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada químicamente

<220>  
 <221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<400> 3 20  
 tgtgtgaaac aagcgccttc 20

<210> 4  
 20 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(19)  
 <223> cebador

10 <400> 4  
 atgaggtgga cgtagtagt 19

<210> 5  
 <211> 26

15 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> sintetizada químicamente

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(25)  
 <223> cebador

25 <400> 5  
 gaattcatgt gtgaaacaag cgcctt 26

<210> 6  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> artificial

35 <220>  
 <223> sintetizada químicamente

<220>  
 <221> misc\_feature

40 <222> C1)..(24)  
 <223> cebador

<400> 6  
 gtcgacagaa aaccagtgga tctg 24

45 <210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> artificial

50 <220>  
 <223> sintetizada químicamente

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(18)  
 <223> cebador

<400> 7  
 ccatggagaa ggctgggg 18

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN

65 <213> artificial

# ES 2 587 055 T3

<220>  
<223> sintetizada químicamente

5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> cebador

10 <400> 8  
caaagttgtc atggatgacc 20

<210> 9  
<211> 22  
<212> ADN  
15 <213> artificial

<220>  
<223> sintetizada químicamente

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(22)  
<223> cebador

25 <400> 9  
gaattcatgt gtgaaacaag cg 22

<210> 10  
<211> 24  
30 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> sintetizada químicamente

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> cebador

40 <400> 10  
gtc gatgct atctcacag cata 24

<210> 11  
45 <211> 265  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
50 <221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(265)  
<223> Dominio N-terminal de TUCAP-1, aminoácidos 18-282 de proteína TUCAP 1

<400> 11  
55

ES 2 587 055 T3

Met Cys Glu Thr Ser Ala Phe Tyr Val Pro Gly Val Ala Pro Ile Asn  
 1 5 10 15  
 Phe His Gln Asn Asp Pro Val Glu Ile Lys Ala Val Lys Leu Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Arg Thr Gln Leu Pro Tyr Glu Tyr Tyr Ser Leu Pro Phe Cys Gln  
 35 40 45  
 Pro Ser Lys Ile Thr Tyr Lys Ala Glu Asn Leu Gly Glu Val Leu Arg  
 50 55 60  
 Gly Asp Arg Ile Val Asn Thr Pro Phe Gln Val Leu Met Asn Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Lys Lys Cys Glu Val Leu Cys Ser Gln Ser Asn Lys Pro Val Thr Leu  
 85 90 95  
 Thr Val Glu Gln Ser Arg Leu Val Ala Glu Arg Ile Thr Glu Asp Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Val His Leu Ile Ala Asp Asn Leu Pro Val Ala Thr Arg Leu Glu  
 115 120 125  
 Leu Tyr Ser Asn Arg Asp Ser Asp Asp Lys Lys Lys Glu Lys Asp Val  
 130 135 140  
 Gln Phe Glu His Gly Tyr Arg Leu Gly Phe Thr Asp Val Asn Lys Ile  
 145 150 155 160  
 Tyr Leu His Asn His Leu Ser Phe Ile Leu Tyr Tyr His Arg Glu Asp  
 165 170 175  
 Met Glu Glu Asp Gln Glu His Thr Tyr Arg Val Val Arg Phe Glu Val  
 180 185 190  
 Ile Pro Gln Ser Ile Arg Leu Glu Asp Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser  
 195 200 205  
 Ser Cys Thr Leu Pro Glu Gly Thr Asn Ser Ser Pro Gln Glu Ile Asp  
 210 215 220  
 Pro Thr Lys Glu Asn Gln Leu Tyr Phe Thr Tyr Ser Val His Trp Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Ser Asp Ile Lys Trp Ala Ser Arg Val Asp Thr Tyr Leu Thr Met  
 245 250 255  
 Ser Asp Val Gln Ile His Trp Phe Ser  
 260 265

5 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(15)  
 <223> aminoácidos 221-235 de proteína TUCAP-1

<400> 12

Ala Asp Glu Lys Ser Ser Cys Thr Leu Pro Glu Gly Thr Asn Ser  
 1 5 10 15

5 <210> 13  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> sintetizada químicamente

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(25)  
 <223> dúplex de iARN

<400> 13  
 gagugacguc cagaucacu gguuu 25

20 <210> 14  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> sintetizada químicamente

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(25)  
 <223> dúplex de ARN

<400> 14  
 aaaccagugg aucuggacgu cacuc 25

35 <210> 15  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(50)  
 <223> aminoácidos 303-352 de proteína TUCAP 1

45 <400> 15

Arg Thr Leu Arg Lys Asp Ile Ala Asn Tyr Asn Lys Glu Asp Asp Ile  
 1 5 10 15

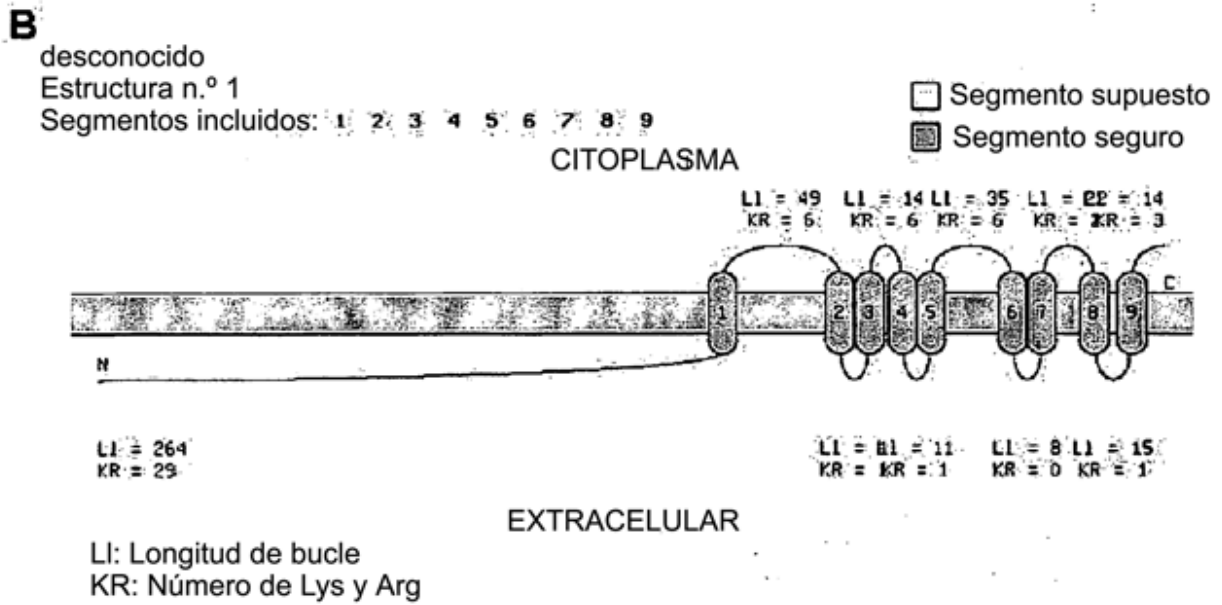
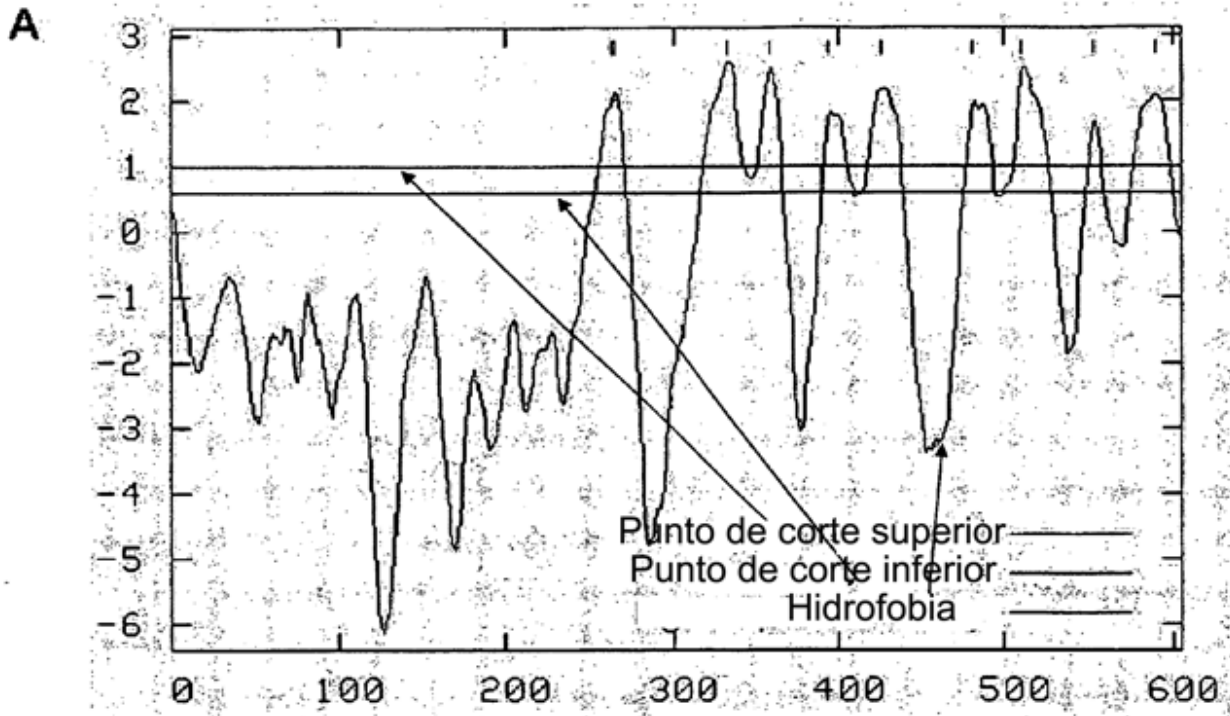
Glu Asp Thr Met Glu Glu Ser Gly Trp Lys Leu Val His Gly Asp Val  
 20 25 30

Phe Arg Pro Pro Gln Tyr Pro Met Ile Leu Ser Ser Leu Leu Gly Ser  
 35 40 45

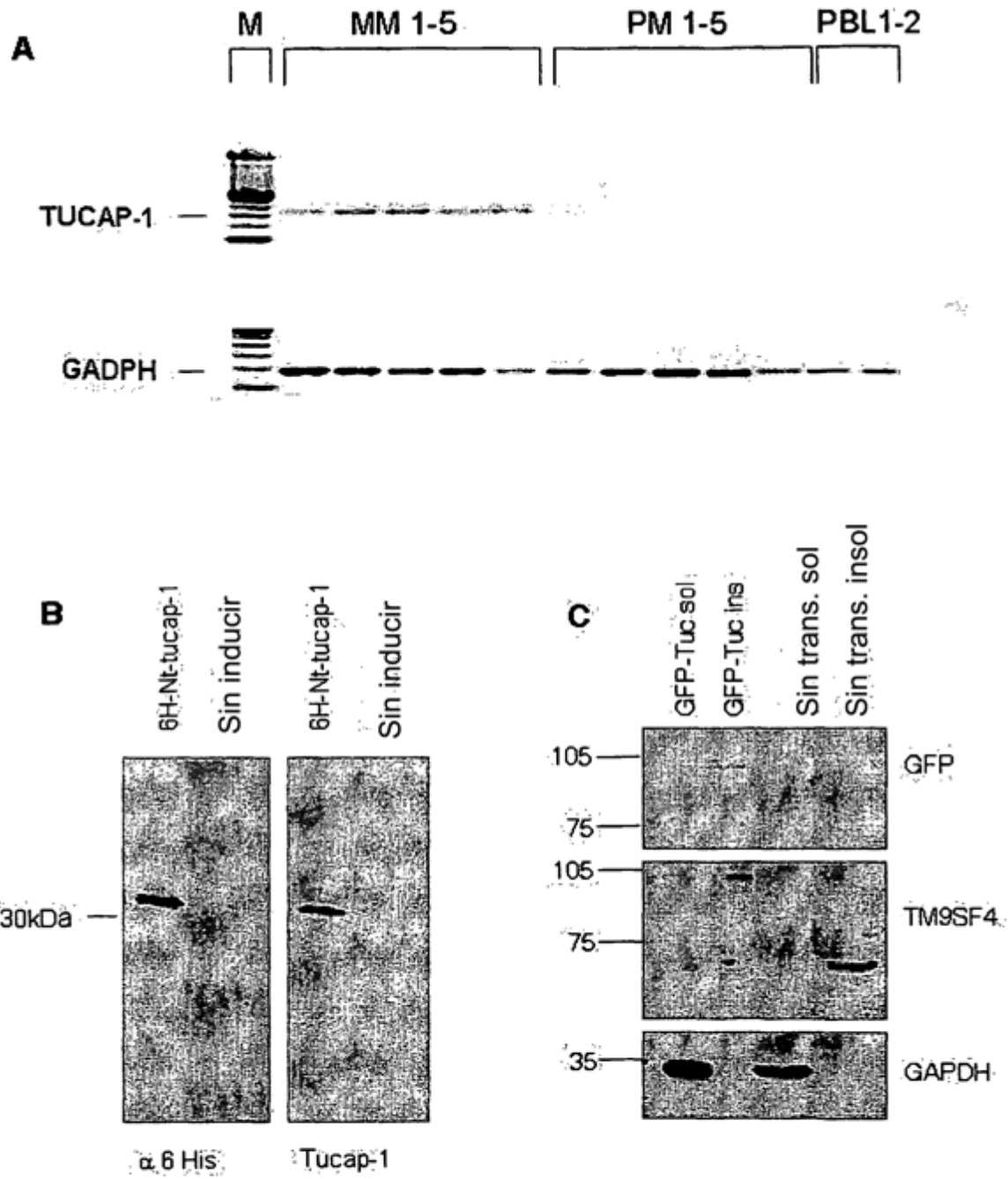
Gly Ile  
 50

**REIVINDICACIONES**

1. Fragmento de polipéptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15.
2. Uso de una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1 como marcador en el diagnóstico de malignidad tumoral.
3. Anticuerpo aislado, generado mediante inmunización de ratones, conejos, cabras o burros con un fragmento peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15, en el que el anticuerpo puede reconocer proteína TM9SF4 humana mediante unión a un fragmento peptídico seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 18-282, 221-235 y 303-352 de SEQ ID NO: 1.
4. Anticuerpo según la reivindicación 3, o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y pertenece a IgG isotipo IgG2A, o IgG isotipo IgG1.
5. Anticuerpo aislado según la reivindicación 3, que es un anticuerpo monoclonal frente a proteína TM9SF4 humana, teniendo dicho anticuerpo una actividad de bloqueo de crecimiento tumoral o actividad de bloqueo de metástasis, generándose dicho anticuerpo mediante inmunización de ratones con dicho fragmento peptídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15, y reconociendo dicho anticuerpo proteína TM9SF4 humana mediante unión a epítomos conformacionales o lineales ubicados entre los aa 18 y 282 ó 221-235 ó 303-352 de SEQ ID NO: 1.
6. Hibridomas seleccionados obtenidos usando células del bazo de ratones seleccionados inmunizados con un fragmento peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15, y produciendo anticuerpos monoclonales que pueden unirse a epítomos conformacionales o lineales de TM9SF4 humana, estando dichos epítomos ubicados entre los aminoácidos 18-282 ó 221-235 ó 303-352 de SEQ ID NO: 1.
7. Kit para detectar tumores malignos *in vitro*, comprendiendo dicho kit anticuerpos monoclonales según la reivindicación 5 y un control positivo titulado que comprende un fragmento peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15, en el que el anticuerpo se usa para detectar una proteína oncogénica según SEQ ID NO: 1 a partir de tejidos y líquidos corporales de pacientes con tumores.
8. Kit según la reivindicación 7, en el que el tumor es un tumor de melanoma.
9. Método para diagnosticar tumores malignos *in vitro*, comprendiendo dicho método una etapa de definir la presencia o ausencia de la expresión de SEQ ID NO: 1 en células tumorales, en el que la presencia de la expresión indica malignidad.
10. Método según la reivindicación 9, en el que la presencia o ausencia de SEQ ID NO: 1 incluye el reconocimiento de la proteína TM9SF4 mediante un anticuerpo monoclonal que puede obtenerse mediante inmunización de ratones con un fragmento peptídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15, reconociendo dichos anticuerpos proteína TM9SF4 humana mediante la unión a unos epítomos conformacionales o lineales ubicados entre los a.a. 188-282 ó 221-235 ó 303-352 de SEQ ID NO: 1.
11. Método para realizar el seguimiento del desarrollo de malignidad de un tumor *in vitro*, comprendiendo dicho método una etapa de definir la presencia o ausencia de expresión de SEQ ID NO: 1 en células tumorales, en el que la presencia de la expresión indica malignidad.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la presencia o ausencia de SEQ ID NO: 1 incluye el reconocimiento de la proteína TM9SF4 mediante un anticuerpo monoclonal que puede obtenerse mediante inmunización de ratones con un fragmento peptídico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15, reconociendo dichos anticuerpos la proteína TM9SF4 humana mediante unión a epítomos conformacionales o lineales ubicados entre los a.a. 188-282 ó 221-235 ó 303-352 de SEQ ID NO: 1.
13. Método según la reivindicación 9 o según la reivindicación 11, en el que el tumor es tumor de melanoma.
14. Ácido nucleico aislado que es sustancialmente complementario a SEQ ID NO: 2, o complementario al ARNm de TM9SF4 para su uso en la inhibición del carácter fagocitario de una célula tumoral.
15. Ácido nucleico aislado para su uso según la reivindicación 14, en el que el carácter fagocitario de la célula tumoral se inhibe mediante silenciamiento de la expresión del gen de TM9SF4.

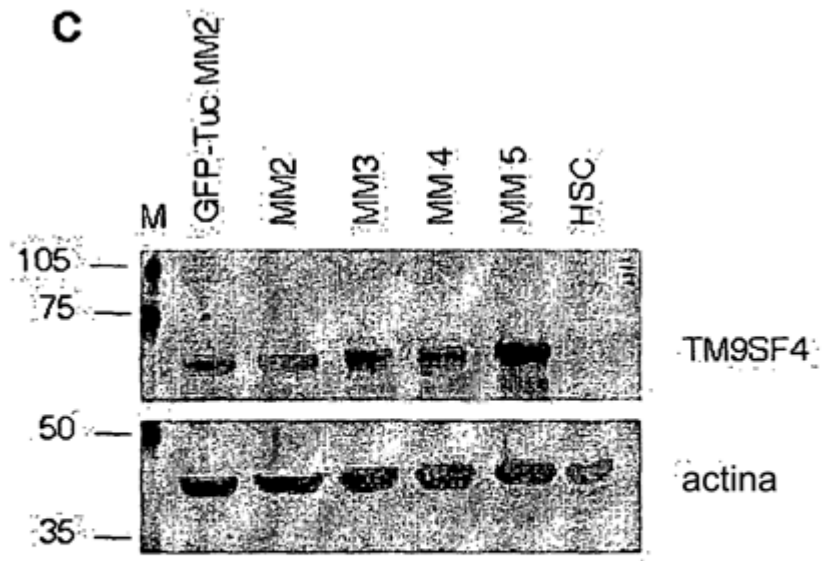


**Figura 1**

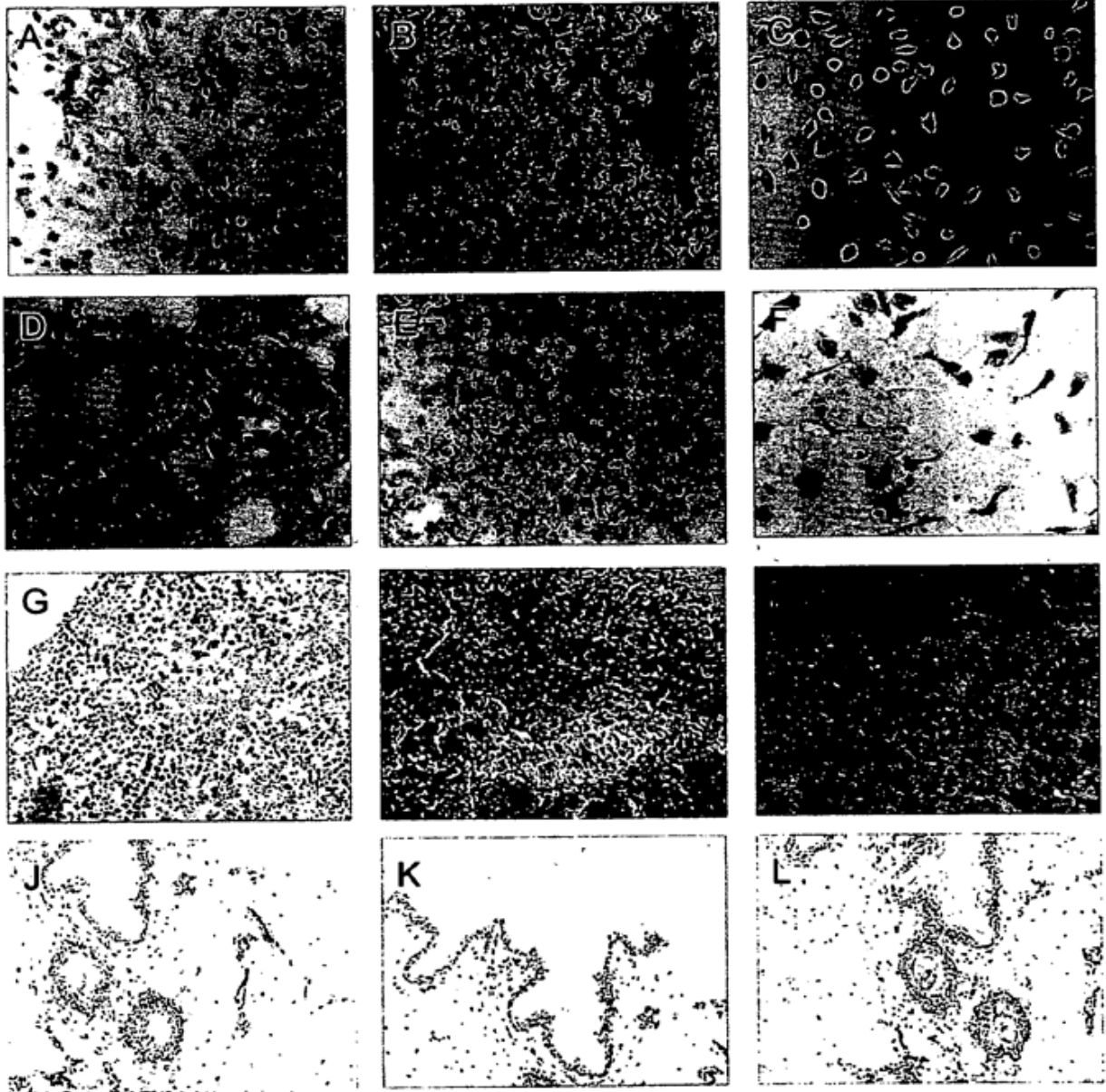


**Figura 2**

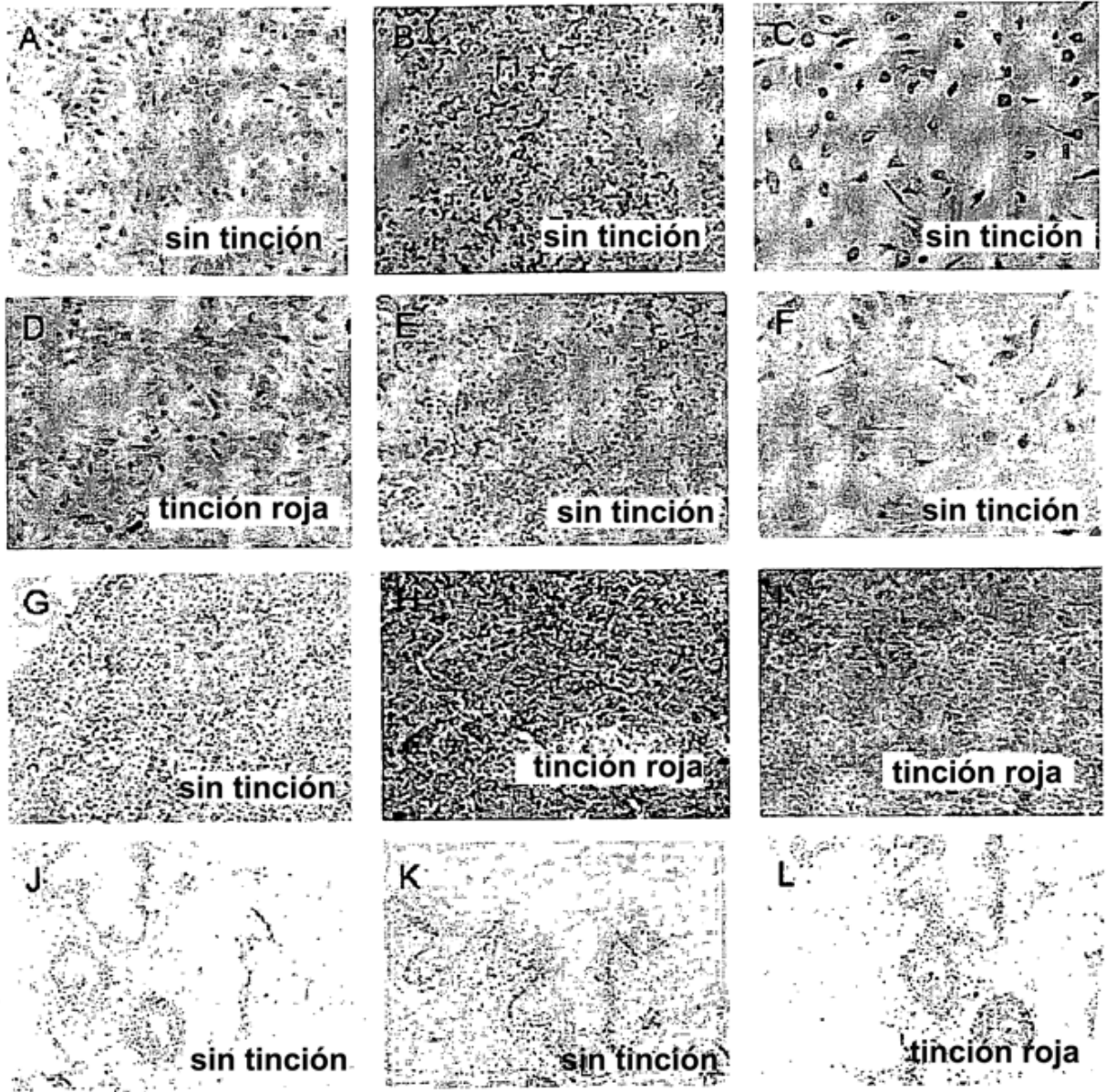




**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 4A**

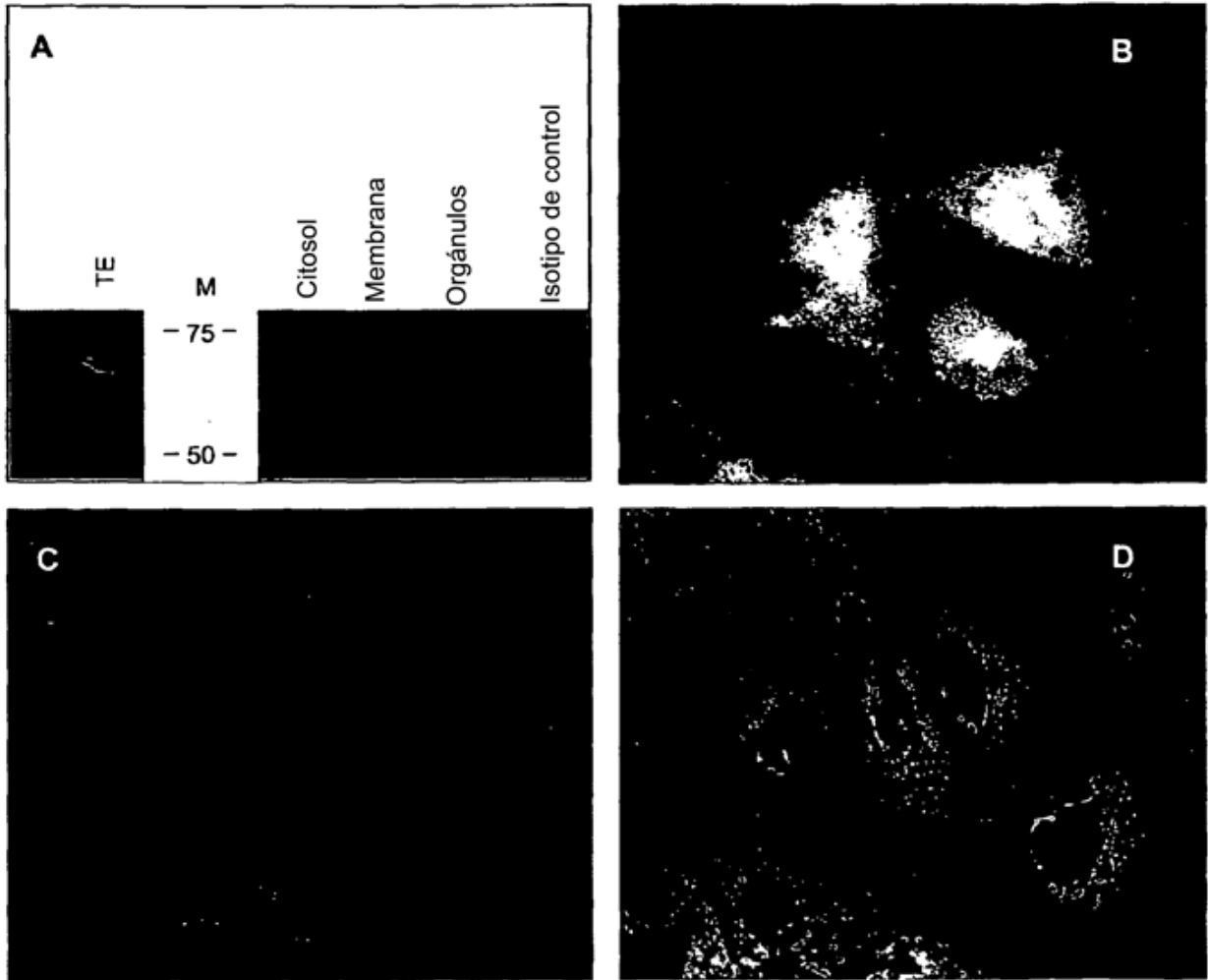
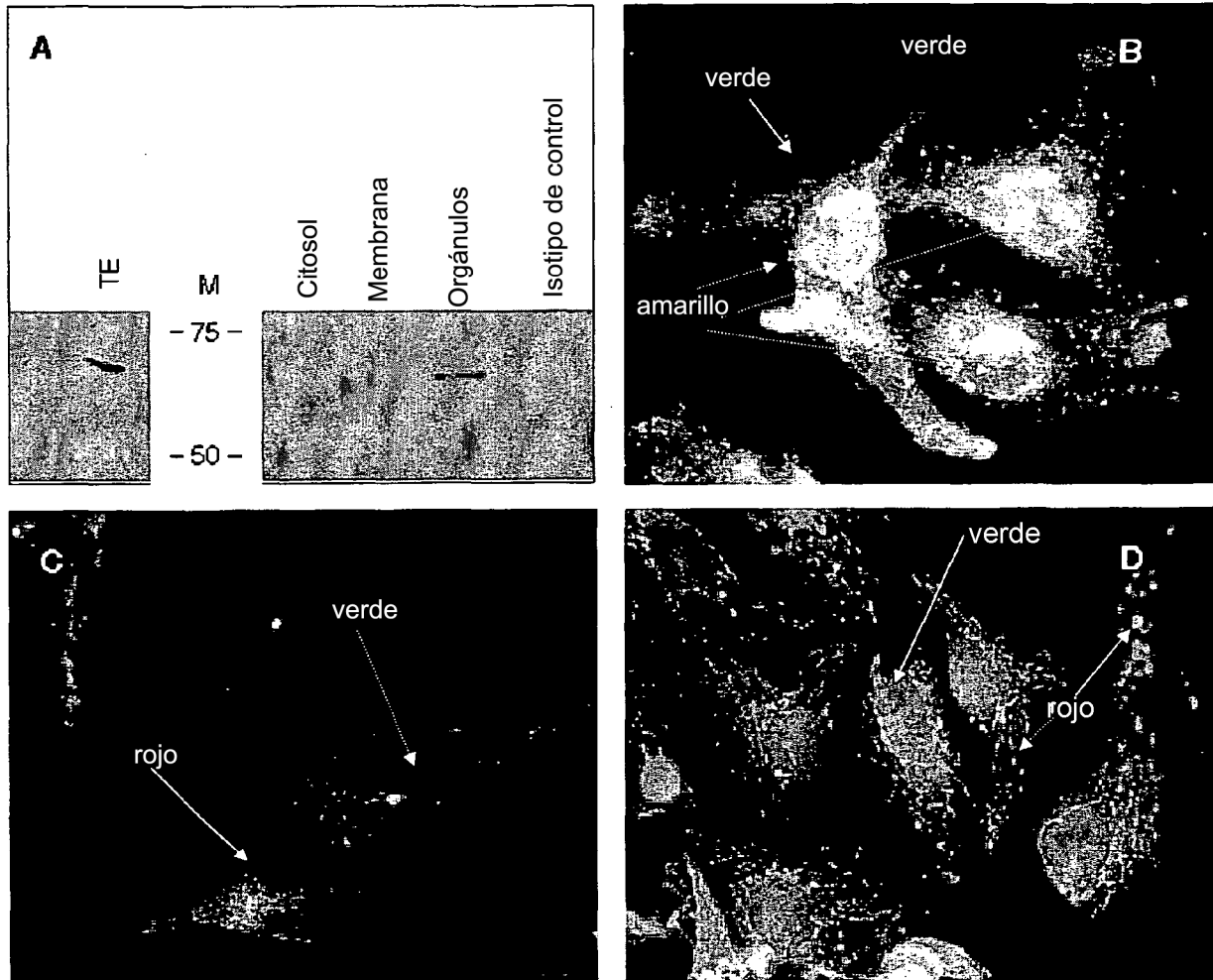


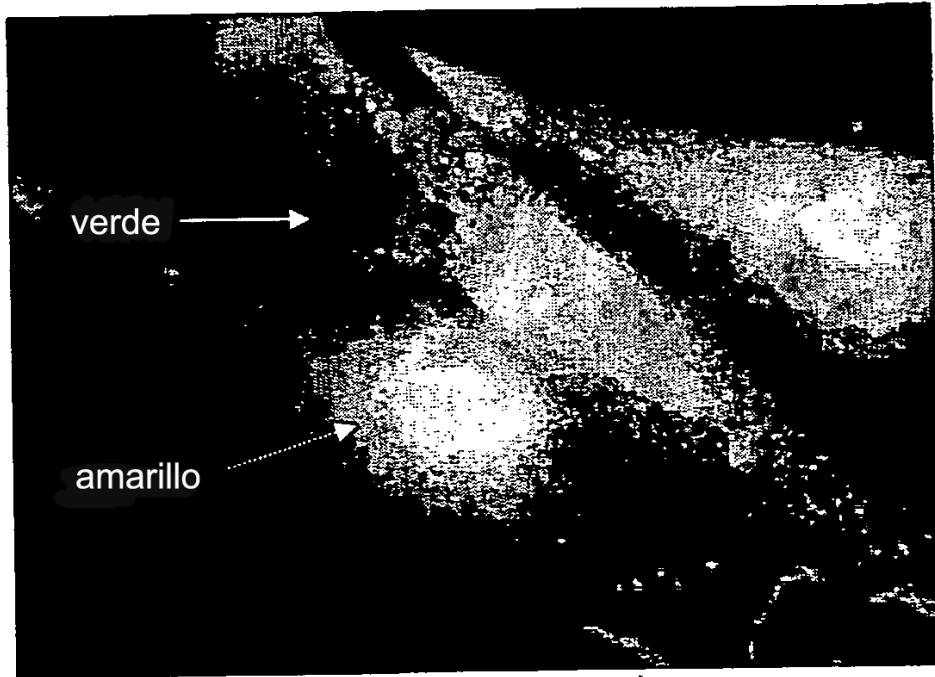
Figura 5



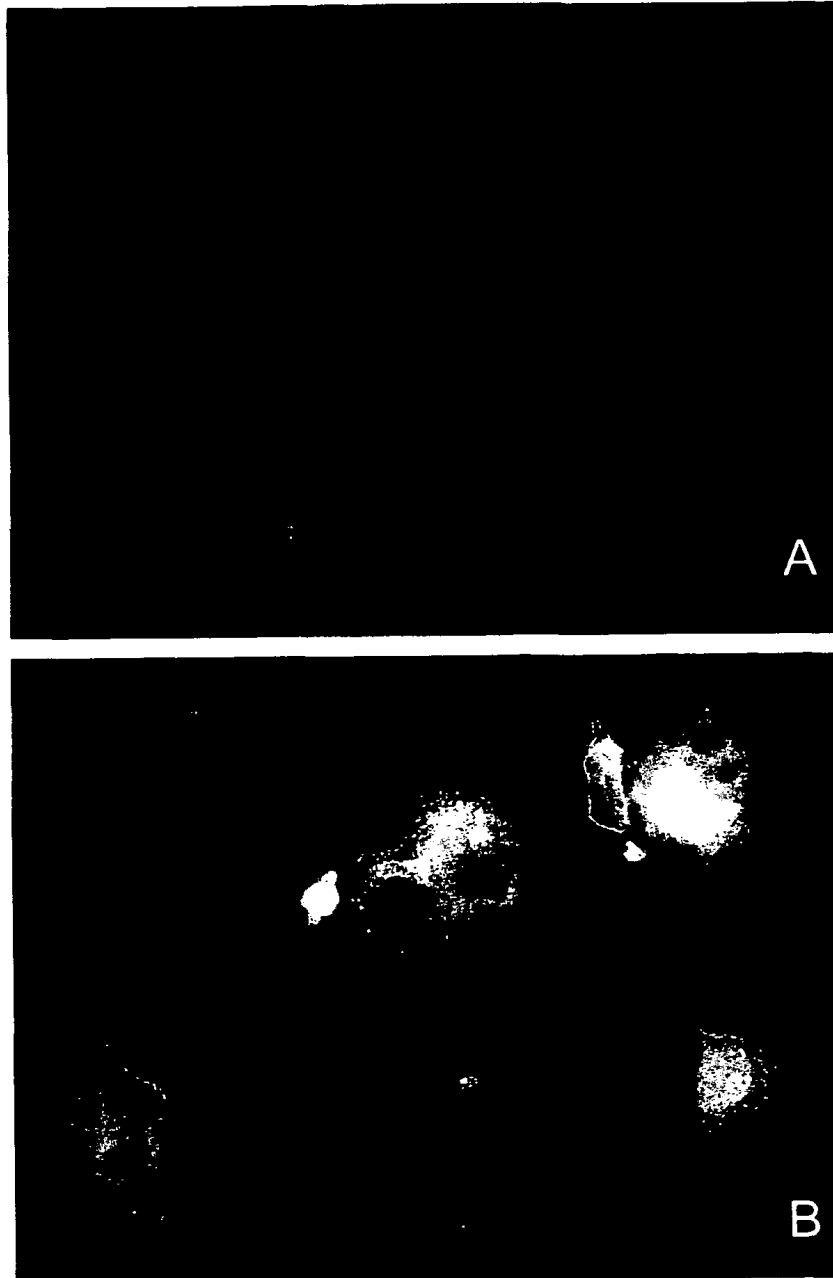
**Figura 5A**



**Figura 6**

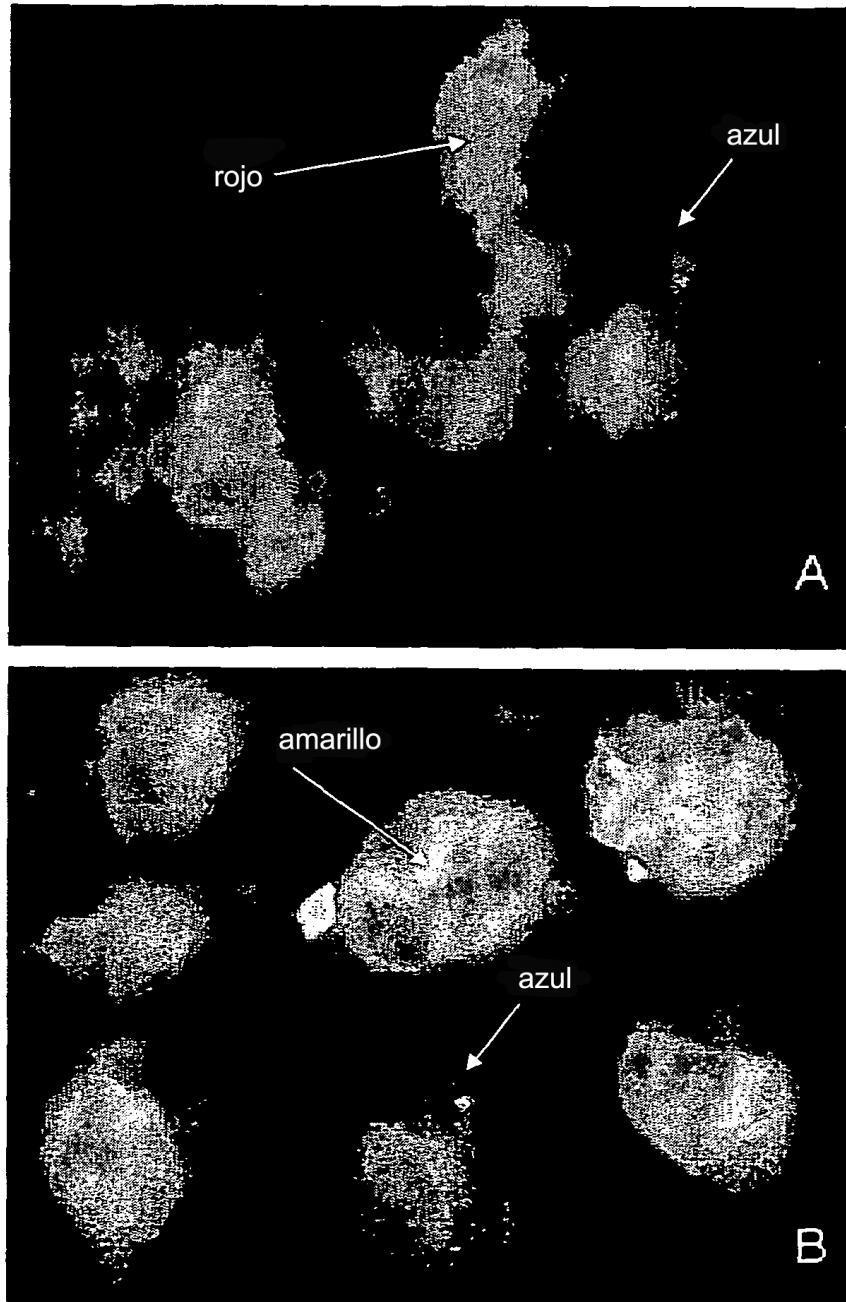


**Figura 6A**

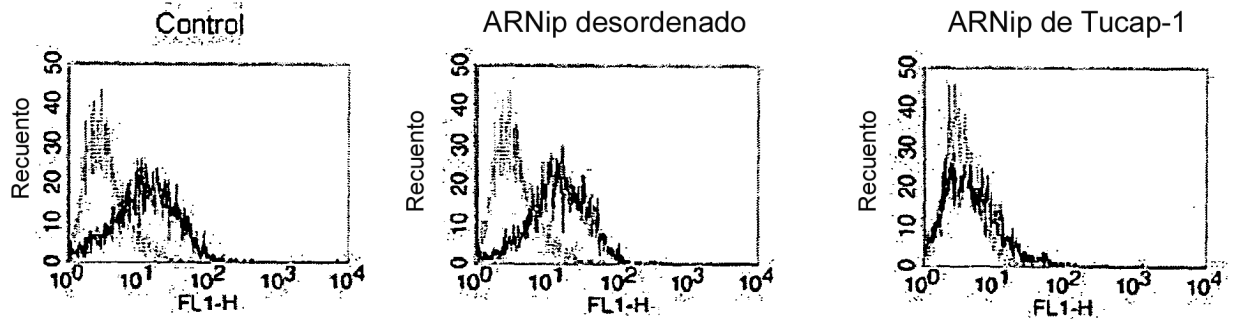


**Figura 7**





**Figura 7A**



**Figura 8**

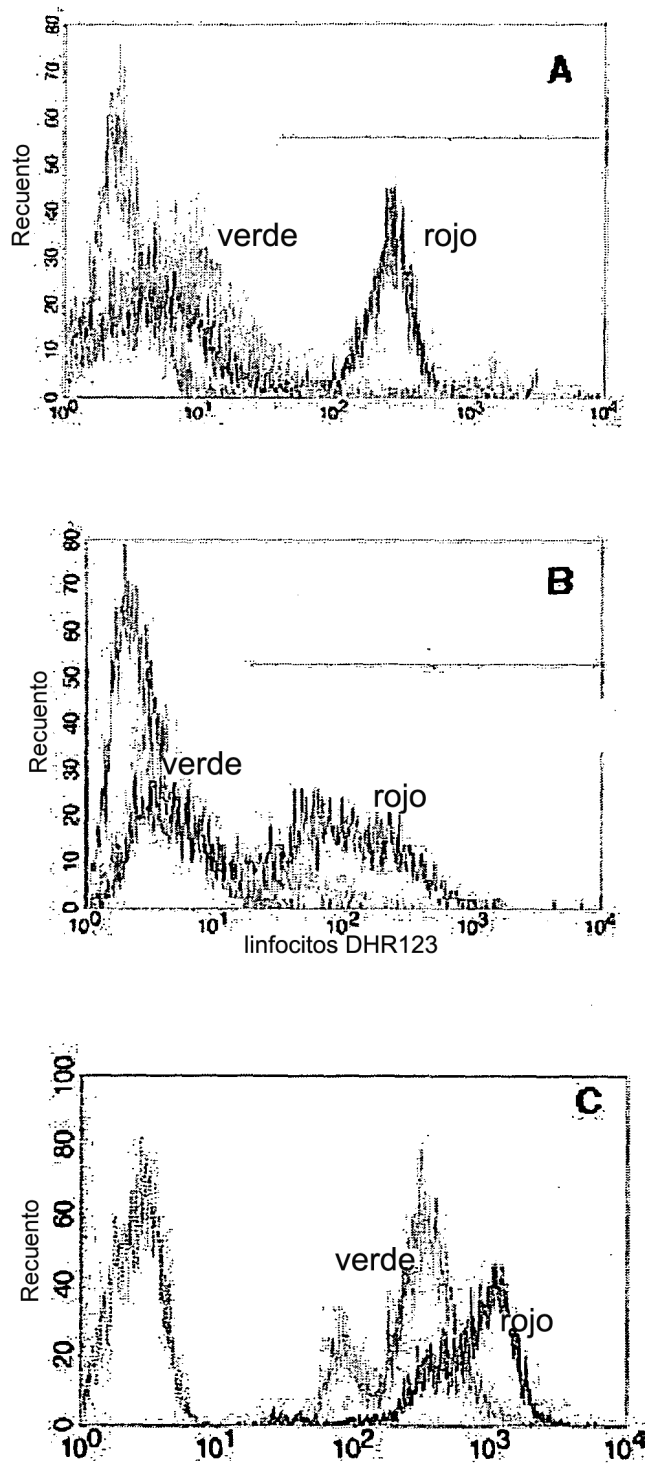
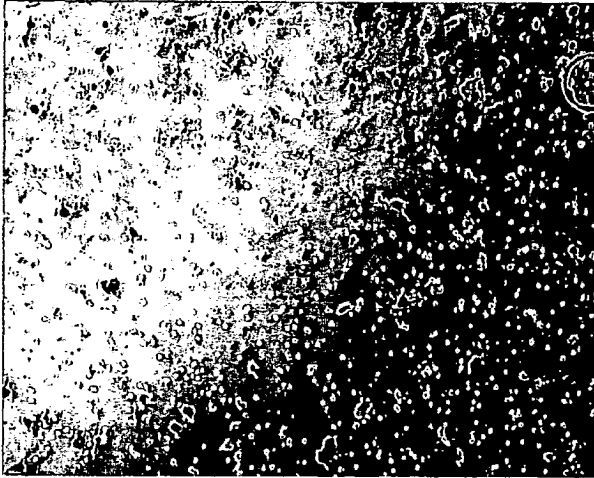
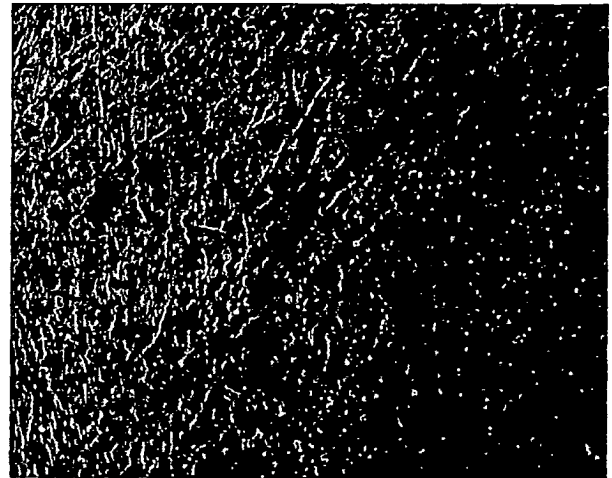


Figura 9



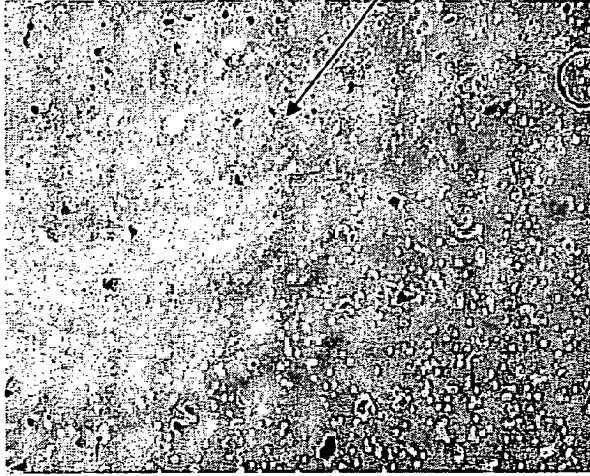
WM743



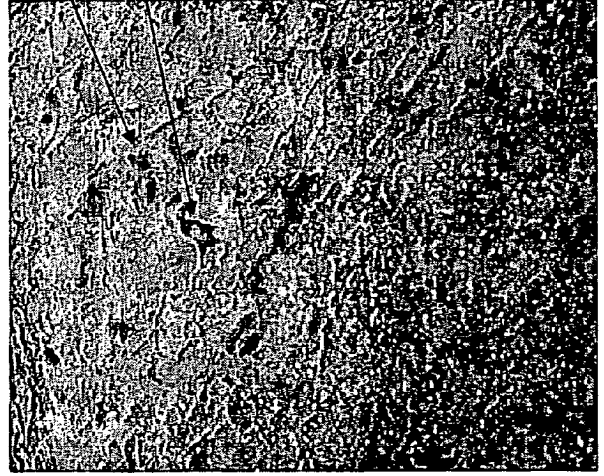
TWM

**Figura 10**

Las flechas indican ejemplos de células teñidas



WM743



TWMM

**Figura 10A**