

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 650**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2008 E 08839285 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2203558**

54 Título: **Translocación y ROS quinasa mutante en el carcinoma pulmonar no microcítico humano**

30 Prioridad:

18.10.2007 US 999668 P

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

08.07.2016

73 Titular/es:

**CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
3 TRASK LANE
DANVERS, MA 01923, US**

72 Inventor/es:

**GU, TING-LEI y
GUO, AILAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 576 650 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

Translocación y ROS quinasa mutante en el carcinoma pulmonar no microcítico humano

Campo de la invención

La invención se refiere, en general, a proteínas y genes implicados en el cáncer, y a la detección, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

Muchos cánceres se caracterizan por alteraciones en las vías de señalización celular que conducen a un control aberrante de los procesos celulares, o a un crecimiento y una proliferación incontrolados de células. Estas alteraciones a menudo son provocadas por cambios en la actividad de proteínas de señalización concretas, tales como quinasas. Entre estos cánceres se encuentra el carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC). El NSCLC es la principal causa de muerte por cáncer en EEUU y es el responsable de aproximadamente 87% de todos los cánceres de pulmón. Se producen aproximadamente 151.000 nuevos casos de NSCLC en EEUU al año, y se calcula que más de 120.000 pacientes morirán al año por la enfermedad solo en EEUU. Véase "*Cancer Facts and Figures 2005*," American Cancer Society. El NSCLC, que comprende tres subtipos diferenciados, a menudo solo se detecta después de que haya metastatizado y, así, la tasa de mortalidad es del 75% a los dos años del diagnóstico.

Se sabe que las translocaciones de genes que producen proteínas de fusión de quinasas con una actividad de señalización aberrante pueden conducir directamente a ciertos cánceres. Por ejemplo, se ha demostrado directamente que la oncoproteína BCR-ABL, una proteína de fusión de tirosina quinasa, es el agente causal de la leucemia mielógena crónica humana (CML). La oncoproteína BCR-ABL, que se encuentra en al menos 90-95% de los casos de CML, es generada por la translocación de secuencias génicas de la proteína tirosina quinasa c-ABL sobre el cromosoma 9 a la secuencias BCR sobre el cromosoma 22, lo cual produce el denominado cromosoma Filadelfia. Véase, por ejemplo, Kurzock *et al.*, N. Engl. J. Med., 319: 990-998 (1988). La translocación también se observa en casos de leucemia linfocítica aguda y AML.

Se han descrito translocaciones de genes que conducen a proteínas mutantes o de fusión implicadas en una diversidad de otros cánceres. Por ejemplo, Falini *et al.*, Blood, 99(2): 409-426 (2002), resumen las translocaciones que se sabe que aparecen en cánceres hematológicos. Hasta la fecha, solo se ha descrito un número limitado de translocaciones de genes y proteínas mutantes que aparecen en cánceres, que incluyen la translocación t(15;19) que implica a Notch3. Véase Dang *et al.*, J. Natl. Can. Instit., 92 (16): 1355-1357 (2000). El documento WO2007/084631 describe secuencias de proteínas de fusión de la proteína SLC34A2 con una ROS quinasa que surge de translocaciones de genes observadas en el NSCLC humano. Se han descubierto defectos en la expresión y/o la actividad de la proteína de unión al ARN-6 (RBM-6) en carcinomas pulmonares microcíticos y no microcíticos. Véase, Drabkin *et al.*, Oncogene, 8(16):2589-2597 (1999).

La CD74 es una proteína de membrana integral que actúa como una proteína chaperona de MHC de clase II. Se han descrito defectos en la expresión de ROS quinasa que resultan de la translocación FIG-ROS del(6)(q21,q21) en el glioblastoma. Véase Charest *et al.*, Genes Chromos. Canc., 37(1): 58-71 (2003). También se ha descrito una forma truncada de ROS quinasa que es capaz de dirigir el crecimiento tumoral en ratones. Véase Birchmeier *et al.*, Mol. Cell. Bio., 6(9): 3109-3115 (1986). Hasta la fecha, no se conoce ninguna mutación puntual activadora que aparezca en la ROS quinasa.

La identificación de translocaciones y mutaciones en los cánceres humanos resulta muy deseable, porque puede conducir al desarrollo de nuevos productos terapéuticos que se dirijan a dichas proteínas de fusión o mutantes, y a nuevos diagnósticos para identificar pacientes que presenten dichas translocaciones de genes. Por ejemplo, BCR-ABL se ha convertido en una diana para el desarrollo de productos terapéuticos para tratar la leucemia. En fechas muy recientes, Gleevec® (mesilato de imatinib, STI-571), un inhibidor de molécula pequeña de la ABL quinasa, ha sido aprobado para el tratamiento de la CML. Este fármaco es el primero de una nueva clase de agentes antiproliferativos diseñados para interferir con las vías de señalización que dirigen el crecimiento de células tumorales. El desarrollo de este fármaco representa un avance significativo frente a las terapias convencionales para la CML y ALL, quimioterapia y radiación, que están plagadas de efectos secundarios muy conocidos y que a menudo tienen un efecto limitado, puesto que no pueden dirigirse específicamente a las causas subyacentes de las malignidades. De forma similar, se han descrito reactivos y métodos para detectar específicamente la proteína de fusión BCR-ABL en pacientes para identificar a los pacientes que puedan responder mejor a los inhibidores dirigidos, tales como Gleevec®.

Por consiguiente, sigue siendo necesaria la identificación de nuevas translocaciones o mutaciones de genes que produzcan proteínas de fusión o mutantes implicadas en el avance de cánceres humanos, que incluyen cánceres de pulmón, tales como NSCLC, y el desarrollo de nuevos reactivos y métodos para el estudio y la detección de dichas proteínas de fusión. La identificación de dichas proteínas de fusión, entre otras cuestiones, permite, de modo deseable, la aparición de nuevos métodos para seleccionar pacientes para las terapias dirigidas, así como para la selección de nuevos fármacos que inhiban dichas proteínas mutantes/de fusión.

Sumario de la invención

La invención es como se describe en las reivindicaciones de la presente. Ahora se ha identificado una nueva translocación de un gen, (5q32, 6q22), en el carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC) que produce proteínas de fusión que combinan parte de CD74 con la ROS quinasa precursora de la proteína tirosina quinasa del protooncogén. Se espera que las proteínas de fusión de CD74-ROS conserven la actividad ROS tirosina quinasa y que dirijan la proliferación y la supervivencia de NSCLC en un subconjunto de dichos cánceres en los que se expresa la proteína de fusión. Por tanto, la invención proporciona, en parte, polinucleótidos aislados y vectores que codifican los polipéptidos de ROS mutantes descritos, sondas y ensayos para detectarlos, polipéptidos de ROS mutante aislados, polipéptidos mutantes recombinantes, y reactivos para detectar los polipéptidos y polinucleótidos de ROS mutante. La identificación descrita de las nuevas proteínas de ROS quinasa mutantes y la translocación de CD74 permite desarrollar nuevos métodos para determinar la presencia de polipéptidos y polinucleótidos de ROS mutante en una muestra biológica, y métodos para seleccionar compuestos que inhiban a las proteínas de quinasa mutante. Los aspectos y las realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 - muestra la localización del gen CD74 y el gen ROS sobre los cromosomas 5q y 6q, respectivamente (panel A), y las localizaciones de los dominios de las proteínas de CD74 y ROS de longitud completa, así como los de la proteína de fusión de CD74-ROS (paneles B y C). La zona de unión de la fusión se produce en el resto 1853 cadena arriba del dominio transmembrana de ROS.

Fig. 2 - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la proteína de fusión de CD74-ROS humana (SEQ ID NO:1) (panel superior), indicándose también la secuencia de ADN (SEQ ID NO:2) (panel inferior); los restos del resto CD74 están subrayados, y los restos del dominio quinasa de ROS se marcan en negrita.

Fig. 3 - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la proteína CD74 humana (SEQ ID NO:3) (n.º de registro de SwissProt P04233) (panel superior), indicándose también la secuencia de ADN (SEQ ID NO:4) (n.º de registro de GeneBank NM_001025159) (panel inferior); los restos implicados en la translocación están subrayados.

Fig. 4A - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la ROS quinasa humana (SEQ ID NO:5) (n.º de registro de SwissProt P08922); los restos implicados en la translocación están subrayados.

Fig. 4B - es la secuencia de ADN codificadora de la ROS quinasa humana (SEQ ID NO:6) (n.º de registro de GeneBank NM_002944); los restos implicados en la translocación están subrayados.

Fig. 5 - es el gel que muestra la detección del gen de fusión formado por la translocación de CD74 y ROS mediante RT-PCR; se muestran las secuencias de los cebadores para CD74-F1 (arriba) y ROS-GSP3 (abajo) (SEQ ID NO:9 y 10, respectivamente).

Fig. 6 - es una imagen que muestra la detección específica de la fusión/translocación de ROS (en un paciente y una línea celular de NSCLC humana) mediante FISH empleando una sonda de escisión de 2 colores.

Descripción detallada de la invención

Según la invención, ahora se ha identificado una translocación de un gen, previamente desconocida, que produce una proteína de fusión de quinasa mutante, CD74-ROS, en el carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC), un subtipo del carcinoma pulmonar. La translocación, que aparece entre el cromosoma (5q32) y el cromosoma (6q22), produce una proteína de fusión que combina el N-terminal de CD74 con los dominios transmembrana y quinasa de la ROS quinasa precursora de la proteína tirosina quinasa del protooncogén, un receptor de tirosina quinasa de 2347 aminoácidos. Se espera que la proteína de fusión de CD74-ROS resultante, una proteína de 703 aminoácidos, conserve la actividad quinasa y dirija la proliferación y la supervivencia de un subconjunto de tumores NSCLC humanos en los que se expresa la proteína de fusión.

Aunque se han descrito unas pocas translocaciones de genes que producen proteínas de fusión aberrantes que implican a la ROS quinasa, que incluyen la translocación FIG-ROS del(6)(q21,q21) en el glioblastoma (véase Charest *et al.* (2003), *supra.*) y una forma activa truncada de ROS (véase Birchmeier *et al.*, *supra.*), la translocación de CD74-ROS y la proteína de fusión descritas en la presente son nuevas, y esta quinasa de fusión es la primera indicada en un paciente con NSCLC humano primario. La CD74 es una proteína de membrana integral que actúa como una proteína chaperona de MHC de clase II. ROS es un receptor transmembrana de tirosina quinasa que pertenece a la subfamilia de los receptores de insulina, y está implicado en procesos de proliferación y diferenciación celular. En los seres humanos, ROS se expresa en células epiteliales de una diversidad de tejidos diferentes. Se han descubierto defectos en la expresión y/o activación de ROS en el glioblastoma, así como en tumores del sistema nervioso central. Véase, por ejemplo, Charest *et al.* (2003), *supra.*

Tal como se describe a continuación, el gen de translocación y la proteína de fusión de CD74-ROS han sido aislados y secuenciados y se han producido los ADNc para expresar la proteína de la quinasa mutante. Por consiguiente, la invención proporciona, en parte, polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de fusión de CD74-ROS, sondas

de ácidos nucleicos que se hibridan con dichos polinucleótidos, y métodos, vectores y células hospedantes para utilizar dichos polinucleótidos para producir polipéptidos de ROS mutante recombinante. La invención también proporciona, en parte, polipéptidos aislados que comprenden secuencias de aminoácidos que codifican polipéptidos de fusión de CD74-ROS, polipéptidos mutantes recombinantes, y reactivos aislados que se unen específicamente y/o detectan los polipéptidos de fusión de CD74-ROS, pero que no se unen ni detectan CD74 de tipo salvaje o ROS de tipo salvaje. Estos aspectos de la invención, que se describen con más detalle a continuación, serán útiles, entre otros aspectos, para estudiar más a fondo los mecanismos de los cánceres dirigidos por la expresión/actividad de ROS quinasa mutante, para identificar carcinomas pulmonares y otros cánceres caracterizados por las proteínas de fusión/translocación de CD74-ROS, y para practicar los métodos de la invención, tal como se describe más a fondo a continuación.

La identificación de la nueva translocación y los nuevos mutantes de ROS quinasa tiene importantes implicaciones para el diagnóstico y tratamiento potencial de enfermedades, tales como NSCLC, que se caracterizan por esta translocación y/o proteína de fusión. El NSCLC es la principal causa de muerte por cáncer en EEUU, y a menudo resulta difícil de diagnosticar hasta que ha metastatizado, lo cual aumenta la dificultad de tratar o curar esta enfermedad con eficacia. Por tanto, la tasa de mortalidad del NSCLC es del 75% a los dos años del diagnóstico. Véase American Cancer Society, *supra*. Aunque en la actualidad se han aprobado inhibidores de EGFR dirigidos para el tratamiento del NSCLC, se anticipa que esta terapia puede ser parcial o totalmente ineficaz en pacientes que portan tumores en los que se expresa una ROS quinasa mutante (en lugar o además de EGFR) y que dirige la enfermedad, total o parcialmente.

Por tanto, el presente descubrimiento de las proteínas de fusión de CD74-ROS que resultan de la translocación génica en NSCLC, que se espera que dirijan la proliferación y la supervivencia en un subconjunto de tumores NSCLC, permite desarrollar importantes nuevos métodos para identificar con precisión cánceres pulmonares en mamíferos (tales como NSCLC), así como otros cánceres, en los que la proteína de fusión de CD74-ROS o la ROS quinasa mutante se expresan. Es muy probable que estos tumores respondan a inhibidores de la actividad quinasa de las ROS quinasas mutantes. La capacidad para identificar, lo más temprano posible, cánceres que están dirigidos por una ROS quinasa mutante ayudará en gran medida a la determinación clínica de cuál será el producto terapéutico, o la combinación de productos terapéuticos, que serán más apropiados para un paciente concreto, ayudando así a evitar la prescripción de inhibidores que se dirijan a otras quinasas que, de hecho, no sean la principal molécula de señalización que dirija el cáncer.

Por consiguiente, la invención proporciona, en parte, métodos para detectar la presencia de una translocación de CD74-ROS (t(5,6)(q32, q22)) y/o un polipéptido de fusión en un cáncer empleando reactivos específicos de la fusión y específicos de los mutantes de la invención. Estos métodos pueden practicarse, por ejemplo, para identificar un cáncer, tal como un NSCLC, que es probable que responda a un inhibidor de la actividad ROS quinasa de la proteína mutante. La invención también proporciona, en parte, métodos para determinar si un compuesto inhibe el avance de un cáncer caracterizado por un polipéptido de fusión de CD74-ROS. En la presente se describe un método para inhibir el avance de un cáncer que expresa un polipéptido de fusión de CD74-ROS mediante la inhibición de la expresión y/o la actividad del polipéptido mutante. Estos métodos se describen con más detalle a continuación. Puede utilizarse cualquier material y/o método adecuado conocido por los expertos en la técnica para realizar la presente invención. Sin embargo, se describen los materiales y métodos preferidos. Los materiales, reactivos y similares referidos en la siguiente descripción y ejemplos pueden obtenerse de fuentes comerciales, a menos que se indique lo contrario.

Otros aspectos, ventajas y realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación. Las patentes, solicitudes publicadas y bibliografía científica referidas en la presente establecen el conocimiento de los expertos en la técnica y se incorporan en la presente como referencia en su totalidad en el mismo grado en que serían indicadas, de modo específico e individual, para ser incorporadas como referencia. Cualquier conflicto entre cualquier referencia citada en la presente y las indicaciones específicas de esta memoria descriptiva serán resueltos a favor de esta última. De forma similar, cualquier conflicto entre una definición entendida en la técnica de una palabra o expresión y una definición de la palabra o expresión tal como se indica específicamente en esta memoria descriptiva será resuelto a favor de esta última. Tal como se emplea en la presente, los siguientes términos y expresiones tienen los significados indicados. Tal como se emplea en esta memoria descriptiva, las formas en singular "el/la" y "un/una" también incluyen específicamente las formas en plural de los términos a los que se refieren, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "aproximadamente" se emplea en la presente para indicar alrededor o en la región de. Cuando el término "aproximadamente" se emplea junto con un intervalo numérico, el término modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos indicados. En general, el término "aproximadamente" se emplea en la presente para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado con una varianza del 20%.

"Anticuerpo" o "anticuerpos" se refieren a todos los tipos de inmunoglobulinas, que incluyen IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, incluyendo sus fragmentos F_{ab} o de reconocimiento del antígeno, e incluyen los anticuerpos quiméricos, policlonales y monoclonales. Pueden diseñarse y construirse antígenos peptídicos para producir los anticuerpos de la invención, y emplearse según técnicas muy conocidas. Véase, por ejemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, capítulo 5, p. 75-76, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Czernik, Methods In Enzymology, 201: 264-283 (1991); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 21-49 (1962)). La invención también incluye

moléculas de anticuerpo con menos de 4 cadenas, que incluyen anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de camélidos y similares, y componentes del anticuerpo, que incluyen una cadena pesada o una cadena ligera. En algunas realizaciones, una cadena de inmunoglobulina puede comprender, en el orden de 5' a 3', una región variable y una región constante. La región variable puede comprender tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), con regiones de marco intercaladas (FR) para una estructura FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En la invención también se incluyen regiones variables de cadena pesada o ligera, regiones de marco y CDR. Un anticuerpo de la invención puede comprender una región constante de cadena pesada que comprende algunos o todos de una región CH1, una región bisagra, una región CH2 y CH3. Un anticuerpo de la invención puede tener una afinidad de unión (K_D) de 1×10^{-7} M o menor. En otras realizaciones, el anticuerpo se une con una K_D de 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M o menor. En ciertas realizaciones, la K_D es de 1 pM a 500 pM, entre 500 pM y 1 μ M, entre 1 μ M y 100 nM, o entre 100 mM y 10 nM. Los anticuerpos de la invención pueden obtenerse de cualquier especie de animal, preferiblemente un mamífero. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos naturales incluyen anticuerpos derivados de seres humanos, pollos, cabras y roedores (por ejemplo, ratas, hámsteres y conejos), e incluyen roedores transgénicos modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Lonberg *et al.*, documento WO93/12227; patente de EEUU n.º 5.545.806; y Kucherlapati, *et al.*, documento WO91/10741; patente de EEUU n.º 6.150.584, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). Los anticuerpos naturales son anticuerpos producidos por un animal hospedante, aunque la invención también contempla anticuerpos genéticamente alterados en los que la secuencia de aminoácidos se ha cambiado con respecto a la del anticuerpo nativo. Debido a la importancia de las técnicas de ADN recombinante en esta solicitud, no es necesario limitarse a las secuencias de aminoácidos que se encuentran en los anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener las características deseadas. Son muchas las posibles variaciones y pueden variar desde cambiar uno solo o unos pocos aminoácidos a rediseñar completamente la región variable o constante, por ejemplo. Los cambios en la región constante se realizarán, en general, para mejorar o alterar características, tales como la fijación del complemento, la interacción con membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se realizarán para mejorar las características de unión al antígeno. La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se emplea en la presente, se refiere a moléculas de anticuerpos en las que se han reemplazado aminoácidos en las regiones que no se unen al antígeno para que se parezcan más a un anticuerpo humano, aunque siguen manteniendo su capacidad de unión original. Otros anticuerpos que se contemplan específicamente son los anticuerpos oligoclonales. Tal como se emplea en la presente, la expresión "anticuerpos oligoclonales" se refiere a una mezcla predeterminada de anticuerpos monoclonales diferenciados. Véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 95/20401; y las patentes de EEUU n.ºs 5.789.208 y 6.335.163. En una realización, se generan anticuerpos oligoclonales que consisten en una mezcla predeterminada de anticuerpos contra uno o más epítopos en una única célula. En otras realizaciones, los anticuerpos oligoclonales comprenden una pluralidad de cadenas pesadas capaces de aparearse con una cadena ligera común para generar anticuerpos con múltiples especificidades (por ejemplo, publicación PCT WO 04/009618). Los anticuerpos oligoclonales son particularmente útiles cuando se desea dirigirse a múltiples epítopos sobre una única molécula diana. A la vista de los ensayos y epítopos descritos en la presente, los expertos en la técnica pueden generar o seleccionar anticuerpos o mezclas de anticuerpos que sean aplicables para un objetivo previsto y una necesidad deseada. Los anticuerpos recombinantes contra los sitios de fosforilación identificados en la invención también se incluyen en la presente solicitud. Estos anticuerpos recombinantes tienen la misma secuencia de aminoácidos que los anticuerpos naturales o tiene secuencias de aminoácidos alteradas de los anticuerpos naturales en la presente solicitud. Pueden prepararse en cualquier sistema de expresión, que incluye sistemas de expresión procariotas y eucariotas, o empleando métodos de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, documento WO91/17271 y McCafferty *et al.*, documento WO92/01047; patente de EEUU n.º 5.969.108, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). Los anticuerpos pueden modificarse de numerosas formas. Pueden prepararse como anticuerpos monocatenarios (que incluyen productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños o SMIP™), fragmentos Fab y F(ab')₂, etc. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados, quiméricos, desinmunizados o totalmente humanos. Numerosas publicaciones describen los muchos tipos de anticuerpos y los métodos para modificar dichos anticuerpos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU n.ºs 6.355.245; 6.180.370; 5.693.762; 6.407.213; 6.548.640; 5.565.332; 5.225.539; 6.103.889; y 5.260.203. Los anticuerpos genéticamente alterados deben ser funcionalmente equivalentes a los anticuerpos naturales mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados proporcionan una mayor estabilidad y/o eficacia terapéutica. Los ejemplos de anticuerpos modificados incluyen los que tiene sustituciones conservadoras de restos aminoácidos, y una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no alteren significativamente de manera perjudicial la utilidad de unión al antígeno. Las sustituciones pueden variar desde cambiar o modificar uno o más restos aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, con la condición de que se mantenga la utilidad terapéutica. Los anticuerpos de esta solicitud pueden modificarse de modo postraduccional (por ejemplo, acetilación y/o fosforilación) o pueden modificarse de modo sintético (por ejemplo, la unión de un grupo marcador). Los anticuerpos con regiones constantes o Fc variantes o modificadas pueden ser útiles para modular funciones efectoras, tales como, por ejemplo la citotoxicidad dependiente del antígeno (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Estos anticuerpos con regiones Fc o constantes variantes o modificadas pueden ser útiles en casos en los que una proteína de selección de origen (tabla 1) se expresa en tejido normal; en estos casos, los anticuerpos variantes sin función efectora pueden producir la respuesta terapéutica deseada sin dañar al tejido normal. Por consiguiente, ciertos aspectos y métodos de la presente descripción se refieren a anticuerpos con funciones efectoras alteradas que comprenden una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos. La expresión "biológicamente activo" se refiere a una proteína que tiene las funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de una molécula

natural. De forma similar, "inmunológicamente activo" se refiere a la capacidad del polipéptido de fusión de CD74-ROS natural, recombinante o sintético, o un polipéptido de ROS truncado, o cualquier de sus oligopéptidos, para inducir una respuesta inmunológica específica en animales o células apropiados y para unirse con anticuerpos específicos.

- 5 La expresión "muestra biológica" se emplea en su sentido más amplio, y significa cualquier muestra biológica sospechosa de contener la fusión de CD74-ROS o polinucleótidos o polipéptidos de ROS truncados o sus fragmentos, y puede comprender una célula, cromosomas aislados de una célula (por ejemplo, una dispersión de cromosomas en metafase), ADN genómico (en disolución o unido a un soporte sólido, tal como para un análisis Southern), ARN (en disolución o unido a un soporte sólido, tal como para un análisis Northern), ADNc (en disolución o unido a un soporte sólido), un extracto de células, sangre, orina, médula ósea, o un tejido, y similares.

10 Todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece la presente invención, a menos que se indique lo contrario. En la presente se remite a diversas metodologías y materiales conocidos por los expertos en la técnica. Los trabajos de referencia convencionales que ofrecen los principios generales de la tecnología del ADN recombinantes incluyen Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989); Kaufman *et al.*, eds., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, ed., Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1991). Los trabajos de referencia convencionales que ofrecen los principios generales de la farmacología incluyen Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11ª ed., McGraw Hill Companies Inc., Nueva York (2006).

"Que se caracteriza por", con respecto a un cáncer y un polipéptido o polinucleótido de ROS mutante significa un cáncer en el que está presente la translocación génica y/o el polipéptido de fusión expresado de CD74-ROS, comparado con un cáncer en el que dicha translocación y/o polipéptido de fusión no están presentes. La presencia de dicho polipéptido de fusión puede dirigir, totalmente o en parte, el crecimiento y la supervivencia de dicho cáncer.

- 25 "Consenso" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ha sido resecuenciada para resolver las bases no designadas, o que se ha extendido empleando XL-PCR™ (Perkin Elmer, Norwalk, Conn.) en la dirección 5' y/o 3' y se ha resecuenciado, o que se ha ensamblado a partir de secuencias solapantes de más de un clon Incyte empleando el sistema de ensamblaje de fragmentos GELVIEW™ (GCG, Madison, Wis.), o que se ha extendido y ensamblado.

- 30 Un "producto terapéutico inhibidor de ROS quinasa" significa cualquier composición que comprende uno o más compuestos, químicos o biológicos, que inhiben, directa o indirectamente, la expresión y/o la actividad de ROS de tipo salvaje o truncada, por sí solo y/o como parte de las proteínas de fusión de CD74-ROS.

Un "derivado" se refiere a una modificación química de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS o el propio polipéptido codificado. Un ejemplo de dicha modificación sería la sustitución de un hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Un derivado de ácido nucleico codifica un polipéptido que conserva las características biológicas fundamentales de la molécula natural.

35 Un "marcador detectable" con respecto a un polipéptido, un polinucleótido o un reactivo descrito en la presente significa una modificación química, biológica u otra modificación, que incluye, pero no se limita a modificaciones de fluorescencia, masa, restos, tintes, radioisótopos, marcadores o marcas, etc., por cuya presencia puede detectarse la molécula de interés.

"Expresión" o "expresado" con respecto a un polipéptido de fusión de CD74-ROS en una muestra biológica significa expresado significativamente, comparado con una muestra control en la que este polipéptido de fusión no está significativamente expresado.

- 45 Un "péptido marcado con un isótopo pesado" (que se emplea de modo intercambiable con un péptido AQUA) significa un péptido que comprende al menos un marcador de isótopo pesado, que es adecuado para la detección o la cuantificación absoluta de una proteína, según se describe en el documento WO/03016861, "Absolute Quantification of Proteins and Modified Forms Thereof by Multistage Mass Spectrometry" (Gygi *et al.*), que se analiza más a fondo a continuación. La expresión "detecta específicamente" con respecto a dicho péptido AQUA significa que el péptido solo detecta y cuantifica polipéptidos y proteínas que contienen la secuencia del péptido AQUA y sustancialmente no detecta polipéptidos y proteínas que no contienen la secuencia del péptido AQUA.

"Aislado" (o "sustancialmente purificado") se refiere a secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos que se retiran de su entorno natural, están aisladas o separadas. Preferiblemente están al menos 60% exentas, más preferiblemente 75% exentas, y lo más preferiblemente 90% o más exentas de cualquier otro componente con el que están asociadas en la naturaleza.

- 55 "Mimético" se refiere a una molécula, cuya estructura se ha desarrollado a partir del conocimiento de la estructura del polipéptido de fusión de CD74-ROS o sus porciones, y, como tal, es capaz de realizar algunas o todas las acciones de moléculas similares a proteínas asociadas a la translocación.

Un polipéptido o polinucleótido de "ROS mutante" significa un polipéptido o polinucleótido de fusión de CD74-ROS según se describe en la presente.

Un "polinucleótido" (o "secuencia de nucleótidos") se refiere a un oligonucleótido, un nucleótido o un polinucleótido, y sus fragmentos o porciones, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que puede ser monocatenario o bicatenario, y representar la hebra sentido o antisentido.

Un "polipéptido" (o "secuencia de aminoácidos") se refiere a una secuencia de un oligopéptido, un péptido, un polipéptido o una proteína, y sus fragmentos o porciones, y a moléculas naturales o sintéticas. Cuando en la presente se menciona una "secuencia de aminoácidos" para indicar una secuencia de aminoácidos de una molécula de proteína natural, la "secuencia de aminoácidos" y expresiones y términos similares, tales como "polipéptido" o "proteína", no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos nativa completa asociada con la molécula de proteína mencionada.

Un "polinucleótido de fusión de CD74-ROS" se refiere a la secuencia de ácido nucleico de un polinucleótido de fusión o un producto del gen de translocación de CD74-ROS sustancialmente purificado según se describe en la presente, obtenido de cualquier especie, en particular de mamífero, que incluye ganado bovino, ovino, porcino, una especie murina, equina y preferiblemente humana, de cualquier fuente, tanto natural, como sintética, semisintética o recombinante.

Un polipéptido de fusión de CD74-ROS se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión de CD74-ROS sustancialmente purificado según se describe en la presente, obtenido de cualquier especie, en particular de mamífero, que incluye ganado bovino, ovino, porcino, una especie murina, equina y preferiblemente humana, de cualquier fuente, tanto natural, como sintética, semisintética o recombinante.

Las expresiones "se une específicamente a" (o "que se une específicamente" o "unión específica"), remitidas a la interacción de un anticuerpo y una proteína o un péptido, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura concreta (es decir, el determinante antigénico o epitopo) sobre la proteína; en otras palabras, el anticuerpo reconoce y se une a una estructura de la proteína específica y no a las proteínas en general. La expresión "no se une" con respecto a la unión de un anticuerpo a secuencias o determinantes antigénicos distintos a los que son específicos para él significa que no reacciona sustancialmente con ellos, comparado con la unión del anticuerpo a un determinante antigénico o secuencia para la cual el anticuerpo es específico.

La expresión "condiciones rigurosas" con respecto a las condiciones de hibridación de secuencias o sondas es la "rigurosidad" que se produce dentro de un intervalo de aproximadamente T_m menos 5 °C (5 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de la sonda o secuencia) de aproximadamente 20 °C a 25 °C por debajo de la T_m . Las condiciones rigurosas típicas son: una incubación durante la noche a 42 °C en una disolución que comprende: formamida al 50%, SSC 5X (NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), disolución de Denhardt 5X, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado 20 microgramos/ml, seguido del lavado de los filtros en SSC 0,1X SSC a aproximadamente 65 °C. Tal como entienden los expertos en la técnica, la rigurosidad de la hibridación puede alterarse para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas idénticas o relacionadas.

Un "variante" de un polipéptido de fusión de CD74-ROS se refiere a una secuencia de aminoácidos que se ha alterado en uno o más aminoácidos. El variante puede tener cambios "conservadores", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina. De modo menos común, un variante puede tener cambios "no conservadores", por ejemplo, la sustitución de una glicina por un triptófano. Otras pequeñas variaciones similares pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos o ambas. Pueden encontrarse indicaciones para determinar cuál resto aminoácido puede sustituirse, insertarse o deleccionarse sin abolir la actividad biológica o inmunológica empleando programas informáticos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR.

A. Identificación de la ROS quinasa mutante en NSCLC humano

La nueva translocación de gen humano descrita en la presente, que se produce entre el cromosoma (5q32) y el cromosoma (6q22) en NSCLC humano y que provoca la expresión de dos proteínas de fusión variantes que combinan el N-terminal (exones 1-6) de CD74 con los dominios transmembrana y quinasa (exones 34-43) de ROS, fue identificada sorprendentemente durante el examen de los perfiles de péptidos fosforilados globales en extractos de un paciente con carcinoma pulmonar no microcítico humano (NSCLC), un subtipo de cáncer de pulmón. Los cromosomas, genes y productos implicados en esta translocación se muestran en la figura 1.

El perfil de fosforilación de esta línea celular se aclaró empleando una técnica recientemente descrita para el aislamiento y la caracterización espectrométrica de masas de péptidos modificados a partir de mezclas complejas (véase la publicación de patente de EEUU n.º 20030044848, Rush *et al.*, "Immunoaffinity Isolation of Modified Peptides from Complex Mixtures" (la técnica "IAP"), tal como se describe más a fondo en el ejemplo 1 de la presente. La aplicación de la técnica IAP empleando un anticuerpo específico de fosfotirosina (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Beverly, MA, 2003/04 n.º de cat. 9411) demostró que un paciente con NSCLC expresa la ROS quinasa (en contraste con la mayoría de los otros pacientes con NSCLC, que no la expresan). La selección

identificó muchas otras quinasas activadas en este paciente que incluye ROS. Después, el análisis de la secuencia 5' a ROS mediante 5' RACE descubrió que la quinasa estaba fusionada con el N-terminal de CD74 (véase la figura 5).

5 Tal como se muestra en el panel B de la figura 1, la translocación de CD74-ROS combina el N-terminal de CD74 (aminoácidos 1-208) con los dominios transmembrana y quinasa de ROS (aminoácidos 1853-2347) (véase también SEQ ID NO:1), para producir una fusión (véase el panel C de la figura 1). La translocación conserva el dominio transmembrana más 5' de CD74. Se espera que las proteínas de fusión de CD74-ROS resultantes, que comprenden 703 aminoácidos (véase el panel C de la figura 1 y las figuras 2 (SEQ ID NO:1) conserven la actividad quinasa de ROS.

10 El perfil de fosfopéptidos global y el análisis FISH de tumores NSCLC humanos indican que un pequeño porcentaje de pacientes de hecho no portan esta mutación (véanse los ejemplos 1 y 3), y estos pacientes pueden beneficiarse de la terapia de inhibidores de ROS.

B. Polinucleótidos aislados

15 La presente invención proporciona, en parte, polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de fusión de CD74-ROS, sondas de nucleótidos que se hibridan con dichos polinucleótidos, y métodos, vectores y células hospedantes para utilizar dichos polinucleótidos para producir polipéptidos de fusión recombinantes. A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias de nucleótidos determinadas mediante la secuenciación de una molécula de ADN en la presente se determinaron empleando un secuenciador de ADN automático (tal como el modelo 373 de Applied Biosystems, Inc.), y todas las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por las moléculas de ADN

20 determinadas en la presente se determinaron utilizando un secuenciador de péptidos automático. Tal como se conoce en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada mediante esta estrategia automática, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en la presente puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas mediante un proceso automático generalmente son al menos aproximadamente 90% idénticas, más generalmente de al menos aproximadamente 95% al menos a aproximadamente 99,9% idénticas a la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse con más precisión mediante otras estrategias, que incluyen métodos de secuenciación de ADN manuales muy conocidos en la técnica. Tal como se conoce también en la técnica, una única inserción o delección en una secuencia de nucleótidos determinada, comparada con la secuencia real, provocará un desplazamiento de marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos, de modo que la secuencia de aminoácidos prevista codificada por una secuencia de nucleótidos determinada será completamente diferente de la secuencia de aminoácidos realmente codificada por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto de dicha inserción o delección. A menos que se indique lo contrario, cada secuencia de nucleótidos indicada en la presente se presenta como una secuencia de desoxirribonucleótidos (abreviados como A, G, C y T). Sin embargo, una "secuencia de nucleótidos" de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido significa, para un polinucleótido o molécula de ADN, una secuencia de desoxirribonucleótidos, y para un polinucleótido o molécula de ARN, la correspondiente secuencia de ribonucleótidos (A, G, C y U), en la que cada desoxirribonucleótido de timidina (T) en la secuencia de desoxirribonucleótidos especificada está reemplazada por el ribonucleótido uridina (U). Por ejemplo, la referencia a una molécula de ARN que tenga la secuencia de SEQ ID NO:2 o indicada empleando abreviaturas de desoxirribonucleótidos pretende indicar una molécula de ARN que tiene una secuencia en la que cada desoxirribonucleótido A, G o C de SEQ ID NO:2 ha sido reemplazado por el correspondiente ribonucleótido A, G o C, y cada desoxirribonucleótido T ha sido reemplazado por un ribonucleótido U.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1; (b)

45 una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal de CD74 (restos 1-208 de SEQ ID NO:3) y el dominio quinasa de ROS (restos 1945-2222 of SEQ ID NO:5); (c) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos N-terminal de CD74 (restos 1-624 de SEQ ID NO:4) y la secuencia de nucleótidos del dominio quinasa de ROS (restos 6032-6865 de SEQ ID NO:6); (d) una secuencia de nucleótidos que comprende al menos seis nucleótidos contiguos que incluyen la zona de unión de la fusión (restos 622-627 de SEQ ID NO:2) de un polinucleótido de fusión de CD74-ROS; (e)

50 una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos seis aminoácidos contiguos que incluyen la zona de unión de la fusión (restos 208-209 de SEQ ID NO:1) de un polipéptido de fusión de CD74-ROS; y (f) una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de (a)-(e).

Empleando la información proporcionada en la presente, tal como las secuencias de nucleótidos en las figuras 2 (SEQ ID NO:2) puede obtenerse una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica un polipéptido de ROS mutante de la invención empleando procedimientos de clonación y selección convencionales, tales como los que se emplean para clonar ADNc empleando ARNm como material de partida. El gen de fusión también puede identificarse en bancos de ADNc en otros cánceres o carcinomas de pulmón en los que se produce la translocación de CD74-ROS (Sq32, 6q22), o en los que una delección o una translocación alternativa provoca la expresión de una ROS quinasa truncada que carece del dominio extracelular de la quinasa de tipo salvaje.

La secuencia de nucleótidos determinada de los productos génicos de la translocación de CD74-ROS (SEQ ID NO:2) codifica 703 aminoácidos de la proteína de fusión de quinasa (véase la figura 2 (SEQ ID NO:1) y la figura 1). Los polinucleótidos de fusión de CD74-ROS comprenden la porción de la secuencia de nucleótidos de CD74 de tipo salvaje (véase la figura 3 (SEQ ID NO:3) que codifica el N-terminal de esta proteína (exones 1-6) con la porción de la secuencia de nucleótidos de ROS de tipo salvaje (véase la figura 4 (SEQ ID NO:5) que codifica los dominios transmembrana y de quinasa de esta proteína (exones 34-43). Véase la figura 1.

Tal como se indicó, la presente invención proporciona, en parte, la forma madura de las proteínas de fusión de CD74-ROS. Según la hipótesis de la señal, las proteínas segregadas por las células de mamífero tienen una secuencia conductora secretora o señal que se escinde de la proteína madura después de que se haya iniciado la exportación de la cadena de la proteína en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. La mayoría de las células de mamífero e incluso células de insecto rompen las proteínas segregadas con la misma especificidad. Sin embargo, en algunos casos la ruptura de la proteína segregada no es totalmente uniforme, lo cual produce dos o más especies maduras de la proteína. Además, se sabe desde hace tiempo que la especificidad de ruptura de una proteína segregada está determinada, en último término, por la estructura primaria de la proteína completa, es decir, es inherente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por tanto, la presente invención proporciona, en parte, secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de fusión de CD74-ROS maduro que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADNc identificado como ATCC n.º de depósito ***-****, que se ha depositado en the American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, EEUU) el 20 de septiembre de 2006 según las disposiciones del Tratado de Budapest.

Un polipéptido de CD74-ROS maduro que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADNc depositado significa la forma madura de esta proteína de fusión producida por la expresión en una célula de mamífero (por ejemplo, células COS, según se describe a continuación) del marco de lectura abierto completo codificado por la secuencia de ADN humana del clon contenido en el vector en la célula hospedante depositada.

Tal como se indicó, los polinucleótidos de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, o en forma de ADN que incluye, por ejemplo, ADNc y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido de modo sintético. El ADN puede ser monocatenario o bicatenario. El ADN bicatenario o el ARN puede ser la hebra codificadora, también conocida como hebra sentido, o puede ser la hebra no codificadora, también denominada hebra antisentido.

Los polinucleótidos aislados de la invención son moléculas de ácidos nucleicos, ADN o ARN, que han sido retiradas de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células hospedantes heterólogas o moléculas de ADN purificadas (parcial o sustancialmente) en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas según la presente invención incluyen además las moléculas producidas de modo sintético.

Los polinucleótidos aislados de la invención incluyen las moléculas de ADN mostradas en la figura 2 (SEQ ID NO:2), las moléculas de ADN que comprenden la secuencia codificadora para las proteínas de fusión de CD74-ROS maduras mostradas en la figura 1 (SEQ ID NO:1), y las moléculas de ADN que comprenden una secuencia sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, siguen siendo un polipéptido de ROS mutante de la invención. El código genético es muy conocido en la técnica y, así, los expertos en la técnica pueden generar estos variantes degenerados de la manera habitual.

En otra realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de nucleótidos de translocación de CD74-ROS contenida en el clon de ADNc depositado descrito anteriormente. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico codifica el polipéptido de fusión maduro codificado por el clon de ADNc depositado. En otra realización, la invención proporciona una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal de CD74 (restos 1-208 de SEQ ID NO:3) y el dominio quinasa de ROS (restos 1945-2222 of SEQ ID NO:5). En una realización, el polipéptido que comprende el dominio quinasa de ROS comprende los restos 1853-2347 de SEQ ID NO:5 (véase la figura 1, panel B). En otra realización, la secuencia de aminoácidos N-terminal mencionada anteriormente de CD74 y el dominio quinasa de ROS están codificados por las secuencias de nucleótidos que comprenden los nucleótidos 1-624 de SEQ ID NO:4 y los nucleótidos 6032-6865 de SEQ ID NO:6, respectivamente.

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de nucleótidos que tienen una secuencia complementaria con uno de los polipéptidos de fusión de ROS mutantes de la invención. Estas moléculas aisladas, en particular moléculas de ADN, son útiles como sondas para el cartografiado de genes, mediante la hibridación *in situ* con cromosomas, y para detectar la expresión de la proteína de fusión de CD74-ROS o el polipéptido de ROS quinasa truncado en tejido humano, por ejemplo, mediante un análisis de la transferencia Northern.

La presente invención está dirigida también a fragmentos de las moléculas de ácidos nucleicos aisladas descritas en la presente. Un fragmento de un polinucleótido de CD74-ROS o un polinucleótido de ROS truncado de la invención aislados significa fragmentos con una longitud de al menos aproximadamente 15 nucleótidos, y más preferiblemente de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 40 nucleótidos, que son útiles como cebadores y sondas de diagnóstico según se analiza en la presente. Por supuesto, los fragmentos más grandes con una longitud de aproximadamente 50-1500 nucleótidos también son útiles según la presente invención, así como los fragmentos que se corresponden con la mayor parte, sino toda, de la secuencia de nucleótidos de CD74-ROS del ADNc depositado o tal como se muestra en la figura 2 (SEQ ID NO:2). Un fragmento con una longitud de al menos 20 nucleótidos, por ejemplo, significa fragmentos que incluyen 20 o más bases contiguas de las respectivas secuencias de nucleótidos a partir de las cuales se originan los fragmentos.

La generación de dichos fragmentos de ADN es algo habitual para los expertos en la técnica y puede lograrse, por ejemplo, mediante ruptura con una endonucleasa de restricción o mediante cizallamiento por sonicación de ADN que puede obtenerse del clon de ADNc depositado o sintetizado según la secuencia descrita en la presente. Como alternativa, estos fragmentos pueden generarse directamente de modo sintético.

Las sondas o fragmentos de ácidos nucleicos preferidos de la presente invención incluyen moléculas de ácidos nucleicos que codifican la zona de unión de la fusión de los productos génicos de la translocación de CD74-ROS (véase la figura 1, paneles B y C). Por ejemplo, en ciertas realizaciones preferidas, un polinucleótido aislado de la invención comprende un fragmento/secuencia de nucleótidos que comprende al menos seis nucleótidos contiguos que incluyen la zona de unión de la fusión (restos 622-627 de SEQ ID NO:2) de un polinucleótido de fusión de CD74-ROS. En otra realización preferida, un polinucleótido aislado de la invención comprende un fragmento/secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos seis nucleótidos contiguos que incluyen la zona de unión de la fusión (restos 208-209 de SEQ ID NO:1) de un polipéptido de fusión de CD74-ROS.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido aislado que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con una porción de un polinucleótido de ROS quinasa mutante de la invención según se describe en la presente. Las "condiciones de hibridación rigurosas" significan una incubación durante toda la noche a 42°C en una disolución que comprende: formamida al 50%, SSC 5X (NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), disolución de Denhardt 5X, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado 20 microgramos/ml, seguido del lavado de los filtros en SSC 0,1X SSC a aproximadamente 65 °C.

Un polinucleótido que se hibrida con una "porción" de un polinucleótido significa un polinucleótido (ADN o ARN) que se hibrida con al menos aproximadamente 15 nucleótidos (nt), y más preferiblemente con al menos aproximadamente 20 nt, aún más preferiblemente con al menos aproximadamente 30 nt, y aún más preferiblemente con aproximadamente 30-70 nt del polinucleótido de referencia. Estos son útiles como cebadores y sondas de diagnóstico (por ejemplo, para una PCR) tal como se analizó anteriormente y se analiza con más detalle a continuación.

Por supuesto, los polinucleótidos que se hibridan con una porción más grande del polinucleótido de referencia (por ejemplo, los polinucleótidos de fusión de CD74-ROS maduros descritos en la figura 2 (SEQ ID NO:2), por ejemplo, una porción con una longitud de 50-750 nt, o incluso con la longitud completa del oligonucleótido de referencia, también son útiles como sondas según la presente invención, así como los polinucleótidos que se corresponden con la mayoría, o toda, la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado o las secuencias de nucleótidos que aparecen en la figura 2 (SEQ ID NO:2).

Una porción de un polinucleótido con "una longitud de al menos 20 nucleótidos," por ejemplo, significa 20 o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de referencia. Tal como se indica, estas porciones son útiles, desde un punto de vista de diagnóstico, como una sonda según las técnicas de hibridación de ADN convencionales, o como cebadores para la amplificación de una secuencia diana mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR), según se describe, por ejemplo, en MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª edición, Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), cuya descripción completa se incorpora en la presente como referencia. Por supuesto, un polinucleótido que se hibrida solo con un tramo de secuencia de poli-A (tal como el tramo de poli(A) 3' terminal de las secuencias de CD74-ROS mostradas en la figura 2 (SEQ ID NO:2) o con un tramo complementario de restos T (o U), no se incluye en un polinucleótido de la invención empleado para hibridarse con una porción de un ácido nucleico de la invención, puesto que dicho polinucleótido se hibrida con cualquier molécula de ácido nucleico que contenga un tramo de poli(A) o con su complemento (por ejemplo, prácticamente cualquier clon de ADNc bicatenario).

Tal como se indicó, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención, que codifican un polipéptido de ROS quinasa mutante de la invención, pueden incluir, pero no se limitan a las que codifican la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro, por sí solo; la secuencia codificadora del polipéptido maduro y secuencias adicionales, tales como las que codifican la secuencia conductora o secretora, tal como una secuencia de pre-, o pro- o pre-pro-proteína; la secuencia codificadora del polipéptido maduro, con o sin las secuencias codificadoras adicionales

mencionadas anteriormente, junto con secuencias no codificadoras adicionales, que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a intrones y secuencias 5' y 3' no codificadoras, tales como las secuencias transcritas y no traducidas que desempeñan un papel en la transcripción, el procesamiento del ARNm, que incluye el corte y empalme y las señales de poliadenilación, por ejemplo, la unión a ribosomas y la estabilidad del ARNm; y una secuencia codificadora adicional que codifica aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales.

Así, la secuencia que codifica el polipéptido puede condensarse con una secuencia de marcador, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (Qiagen, Inc.), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Tal como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona la purificación convencional de la proteína de fusión. El marcador "HA" es otro péptido útil para la purificación que se corresponde con un epitopo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe, que ha sido descrito por Wilson *et al.*, Cell, 37:767 (1984). Tal como se analiza a continuación, otras proteínas de fusión de este tipo incluyen el propio polipéptido de fusión de CD74-ROS condensado con Fc en el N- o C-terminal.

La presente invención se refiere además a variantes de moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención, que codifican porciones, análogos o derivados de un polipéptido de fusión de CD74-ROS o un polipéptido de ROS quinasa truncado descritos en la presente. Pueden producirse variantes de modo natural, tales como un variante alélico natural. Un "variante alélico" es una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus concreto sobre un cromosoma de un organismo. Véase, por ejemplo, GENES II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985). Pueden producirse otros variantes no naturales empleando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica.

Estos variantes incluyen los producidos por sustituciones, deleciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar a uno o más nucleótidos. Los variantes pueden estar alterados en regiones codificadoras, en regiones no codificadoras o en ambas. Las alteraciones en las regiones codificadoras pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Entre estas, se prefieren especialmente las sustituciones, adiciones y deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades (por ejemplo, la actividad quinasa) de los polipéptidos de ROS quinasa mutantes descritos en la presente. También se prefieren especialmente, a este respecto, las sustituciones conservadoras.

Otras realizaciones de la invención incluyen polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos 90% idéntica. En algunas realizaciones de la invención, la secuencia de nucleótidos es al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a un polinucleótido de ROS mutante de la invención (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de fusión de RB-ROS que tiene la secuencia de aminoácidos completa mostrada en la figura 2 (SEQ ID NO:1; o una secuencia de nucleótidos que codifica el N-terminal de CD74 y el dominio quinasa de ROS (véase la figura 1, panel B; y las figuras 3 y 4); o una secuencia de nucleótidos complementaria a dichos ejemplos de secuencias).

Un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica un polipéptido de ROS quinasa mutante significa que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica el polipéptido de ROS mutante. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden estar delecionados o sustituidos con otro nucleótido, o una serie de nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden aparecer en las posiciones 5' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier punto entre estas posiciones terminales, intercaladas de modo individual entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

De modo práctico, la determinación de que una molécula de ácido nucleico concreta sea al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos mostradas en la figura 2 (SEQ ID NO:2) o a la secuencia de nucleótidos del clon de ADNc depositado descrito anteriormente puede realizarse de modo convencional empleando programas informáticos conocidos, tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711. El programa Bestfit emplea el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics, 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se emplea Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia concreta es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de un polinucleótido de fusión de CD74-ROS de referencia según la presente invención, los parámetros se ajustan, por supuesto, de modo que se calcula el porcentaje de identidad a lo largo de la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permitan huecos en la homología de hasta 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

La presente invención incluye en su alcance moléculas de ácidos nucleicos al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en la figura 2 (SEQ ID NO:2), o a los nucleótidos 625-2172 de SEQ ID NO:2, o a la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado, independientemente de que codifiquen un polipéptido que tenga actividad ROS quinasa. Esto es debido a que, incluso si una molécula de ácido nucleico concreta no codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad ROS quinasa, los expertos en la técnica aún sabrán cómo emplear la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, como una sonda de hibridación o un cebador para la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención que no codifican un polipéptido que tiene actividad quinasa incluyen, entre otros, (1) el aislamiento del gen de translocación de CD74-ROS o sus variantes alélicas en un banco de ADNc; (2) la hibridación *in situ* (por ejemplo, "FISH") con dispersiones cromosómicas en metafase para proporcionar la localización cromosómica precisa del gen de translocación de CD74-ROS, tal como se describe en Verma *et al.*, HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, Nueva York (1988); y un análisis de la transferencia Northern para detectar la expresión del ARNm de la proteína de fusión de CD74-ROS en tejidos específicos.

En la invención también se incluyen moléculas de ácidos nucleicos que tienen secuencias al menos 95% idénticas a un polipéptido de ROS quinasa mutante de la invención o a la secuencia de ácido nucleico del ADNc depositado, que, de hecho, codifican un polipéptido de fusión que tiene actividad ROS quinasa. Esta actividad puede ser similar, pero no necesariamente idéntica, a la actividad de la proteína de fusión de CD74-ROS descrita en la presente (la proteína de longitud completa, la proteína madura o un fragmento de proteína que conserva la actividad quinasa), según se mide en un ensayo biológico concreto. Por ejemplo, la actividad quinasa de ROS puede estudiarse determinando su capacidad para fosforilar uno o más sustratos peptídicos que contienen tirosina, por ejemplo, el "péptido relacionado con Src" (RRLIEDAEYAARG), que es un sustrato para muchas tirosina quinasa de receptores y de no receptores.

Debido a la degeneración del código genético, los expertos en la técnica reconocerán inmediatamente que un gran número de moléculas de ácidos nucleicos que tienen una secuencia al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticas a la secuencia de ácido nucleico del ADNc depositado o de la secuencia de ácido nucleico mostrada en la figura 2 (SEQ ID NO:2) codificarán un polipéptido de fusión que tenga actividad ROS quinasa. De hecho, puesto que los variantes degenerados de estas secuencias de nucleótidos codifican todos el mismo polipéptido, esto será evidente para los expertos en la técnica incluso si no realizan el ensayo de comparación descrito anteriormente. También se reconoce en la técnica que, para las moléculas de ácidos nucleicos que no son variantes degenerados, un buen número de ellas también codificarán un polipéptido que conserve la actividad ROS quinasa. Esto es debido a que los expertos en la técnica son plenamente conscientes de que es menos probable o no es probable en absoluto que las sustituciones de aminoácidos afecten significativamente a la función de la proteína (por ejemplo, sustituyendo un aminoácido alifático con un segundo aminoácido alifático). Por ejemplo, se proporcionan indicaciones para producir sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas en Bowie *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," Science, 247:1306-1310 (1990), que describe dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos a los cambios. Los expertos en la técnica que estén familiarizados con dichas técnicas también apreciarán cuáles son los cambios en los aminoácidos que es posible que puedan realizarse en una posición concreta de la proteína. Por ejemplo, los restos aminoácidos más enterrados requieren cadenas laterales no polares, mientras que, en general, hay pocas características de las cadenas laterales de la superficie se conservan en general. Otras de estas sustituciones fenotípicamente silenciosas se describen en Bowie *et al.*, *supra.*, y en las referencias citadas en esta referencia.

Pueden utilizarse los métodos para la secuenciación del ADN que son muy conocidos y que en general están disponibles en la técnica para poner en práctica cualquiera de las realizaciones de polinucleótidos de la invención. Los métodos pueden emplear enzimas tales como el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I, SEQUENASE® (US Biochemical Corp., Cleveland, Ohio), Taq polimerasa (Perkin Elmer), polimerasa de T7 termoestable (Amersham, Chicago, Ill.), o combinaciones de polimerasas recombinantes y exonucleasas de corrección de lectura, tal como el sistema de amplificación ELONGASE, comercializado por Gibco BRL (Gaithersburg, Md.). Preferiblemente, el proceso es automático y se realiza con máquinas tales como Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, Nev.), termociclador Peltier (PTC200, MJ Research, Watertown, Mass.) y los secuenciadores de ADN ABI 377 (Perkin Elmer).

Las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido de ROS mutante de la invención pueden extenderse utilizando una secuencia de nucleótidos parcial y empleando diversos métodos conocidos en la técnica para detectar secuencias cadena arriba, tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, un método que puede emplearse, la PCR de "sitio de restricción", emplea cebadores universales para recuperar secuencias desconocidas adyacentes a un locus conocido (Sarkar, G., PCR Methods Applic. 2:318-322 (1993)). En particular, el ADN genómico se amplifica primero en presencia de un cebador para la secuencia del conector y un cebador específico para la región conocida. Los ejemplos de cebadores son los que se indican en el ejemplo 4 en la presente. Las secuencias amplificadas después se someten a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador del conector y otro cebador específico interno al primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada y se secuencian empleando transcriptasa inversa.

También puede utilizarse una PCR inversa para amplificar o extender secuencias empleando cebadores divergentes basados en una región conocida (Triglia *et al.*, Nucleic Acids Res., 16:8186 (1988)). Los cebadores pueden

diseñarse empleando el software de análisis de cebadores OLIGO 4.06 (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), u otro programa apropiado, para que tengan una longitud de 22-30 nucleótidos, para que tengan un contenido en GC del 50% o mayor, y para que se reasocian con la secuencia diana a unas temperaturas de aproximadamente 68-72 °C. El método emplea varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento después se circulariza mediante un acoplamiento intramolecular y se emplea como molde de PCR.

Otro método que puede utilizarse es la PCR de captura, que implica la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en el ADN cromosómico artificial de levadura y humano (Lagerstrom *et al.*, PCR Methods Applic., 1:111-119 (1991)). En este método, también pueden utilizarse múltiples digestiones con enzimas de restricción y acoplamientos para colocar una secuencia bicatenaria modificada en una porción desconocida de la molécula de ADN antes de realizar la PCR. Otro método que puede emplearse para recuperar secuencias desconocidas es el descrito en Parker *et al.*, Nucleic Acids Res., 19:3055-3060 (1991)). Además se pueden utilizar PCR, cebadores anidados, y bancos de PROMOTERFINDER® para realizar un paseo en ADN genómico (Clontech, Palo Alto, Calif.). Este proceso evita la necesidad de seleccionar bancos y es útil para descubrir zonas de unión de intrón/exón.

Cuando se seleccionan ADNc de longitud completa resulta preferible emplear bancos que han sido seleccionados según el tamaño para que puedan incluir ADNc más grandes. También son preferibles los bancos cebados aleatoriamente, ya que contienen más secuencias que contienen las regiones 5' de los genes. El uso de un banco cebado aleatoriamente puede ser especialmente preferible en situaciones en las que un banco de oligo-d(T) no produzca un ADNc de longitud completa. Los bancos genómicos pueden ser útiles para la extensión de la secuencia hacia las regiones reguladoras no transcritas 5' y 3'.

Los sistemas de electroforesis capilar, que están disponibles en el mercado, pueden utilizarse para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de los productos de la secuenciación o de PCR. En particular, la secuenciación capilar puede emplear polímeros fluidos para la separación electroforética, cuatro tintes fluorescentes diferentes (uno para cada nucleótido) que se activan con láser, y la detección de las longitudes de onda emitidas mediante una cámara con un dispositivo de carga acoplada. La intensidad de salida/de la luz puede convertirse en una señal eléctrica empleando un software apropiado (por ejemplo, GENOTYPER™ y SEQUENCE NAVIGATOR™, Perkin Elmer), y el proceso completo desde la carga de las muestras hasta el análisis informático y la presentación electrónica de los datos puede controlarse por ordenador. La electroforesis capilar es especialmente preferible para la secuenciación de pequeños trozos de ADN que puedan estar presentes en cantidades limitadas en una muestra particular.

C. Vectores y células hospedantes

La presente invención también proporciona vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido aislado de la presente invención, células hospedantes que están genéticamente modificadas por vectores recombinantes, y la producción de polipéptidos de CD74-ROS recombinantes, o sus fragmentos, por medio de técnicas recombinantes.

Las construcciones recombinantes pueden introducirse en las células hospedantes empleando técnicas muy conocidas, tales como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, de plásmido, vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser competentes en la replicación o defectuosos en la replicación. En este último caso, la propagación vírica en general se producirá solo en células hospedantes complementadoras.

Los polinucleótidos pueden unirse a un vector que contenga un marcador seleccionable para la propagación en un hospedante. En general, un vector plasmídico se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede encapsularse *in vitro* empleando una línea celular encapsulante apropiada y después transducirse en células hospedantes. La invención puede practicarse con vectores que comprendan regiones de control de acción en cis para el polinucleótido de interés. Los factores de acción en trans apropiados pueden ser suministrados por el hospedante, pueden ser suministrados por un vector complementador o pueden ser suministrados por el propio vector tras su introducción en el hospedante. En ciertas realizaciones preferidas a este respecto, los vectores proporcionan una expresión específica, que puede ser inducible y/o específica del tipo celular (por ejemplo, inducible por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como la temperatura y los aditivos de nutrientes).

La inserción de ADN que comprende el polinucleótido de CD74-ROS o el polinucleótido de ROS truncado de la invención debe unirse operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40, y promotores de LTR retrovíricos, por nombrar unos cuantos. Otros promotores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Las construcciones de expresión también contendrán sitios para el inicio y la terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosomas para la traducción. La porción codificadora de las transcripciones maduras expresadas por las construcciones incluirán preferiblemente un inicio de la traducción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) colocado de forma apropiada al final del polipéptido que se va a traducir.

- Tal como se indicó, los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Estos marcadores incluyen la resistencia a la dihidrofolato reductasa o a la neomicina para un cultivo de células eucariotas, y genes de resistencia a la tetraciclina o la ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de hospedantes apropiados incluyen, pero no se limitan a células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura; células de insecto, tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales, tales como células CHO, COS y de melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivos y las condiciones apropiados para las células hospedantes descritas anteriormente son conocidos en la técnica.
- Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias se incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia. Entre los vectores eucariotas preferidos se encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Otros vectores adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica.
- Entre los promotores bacterianos conocidos adecuados para su uso en la presente invención se incluyen los promotores *lacI* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor *gpt*, los promotores λ PR y PL, y el promotor *trp*. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovíricos, tales como el virus del sarcoma de Rous (RSV), y promotores de metalotioneína, tales como el promotor de metalotioneína-I de ratón.
- En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, puede utilizarse una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como el factor alfa, alcohol oxidasa, y PGH. Para un análisis, véase Ausubel *et al.* (1989), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., y Grant *et al.*, Methods Enzymol., 153:516-544 (1997).
- La introducción de la construcción en la célula hospedante puede realizarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Estos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al.*, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986).
- La transcripción del ADN que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS de la presente invención por eucariotas superiores puede aumentar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de acción en cis del ADN, que normalmente tienen de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula hospedante concreto. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador de SV40, que está localizado en el lado tardío del origen de la replicación en las pares de bases 100 a 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación, y los potenciadores de adenovirus.
- Para la secreción de la proteína traducida hacia el lumen del retículo endoplásmico, hacia el espacio periplásmico o hacia el entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.
- El polipéptido puede expresarse en una forma modificada, tal como una proteína de fusión (por ejemplo, una fusión de GST), y puede incluir no solo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, en particular aminoácidos cargados, puede añadirse al N-terminal del polipéptido para aumentar la estabilidad y persistencia en la célula hospedante, durante la purificación o durante la posterior manipulación y conservación. Además pueden añadirse restos peptídicos al polipéptido para facilitar la purificación. Estas regiones pueden retirarse antes de la preparación final del polipéptido. La adición de restos peptídicos a los polipéptidos para engendrar la secreción o la excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otras cosas, son técnicas familiares y habituales en la técnica. Una proteína de fusión preferida comprende una región heteróloga de una inmunoglobulina que es útil para solubilizar proteínas.
- Por ejemplo, el documento EP-A-O 464 533 (homólogo canadiense 2045869) describe proteínas de fusión que comprenden diversas porciones de regiones constantes de moléculas de inmunoglobulina, junto con otra proteína humana o una parte de esta. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es muy ventajosa para su uso en terapia y en diagnóstico, y esto hace que, por ejemplo, imparta unas mejores propiedades farmacocinéticas (documento EP-A 0232 262). Por otra parte, para algunos usos sería deseable poder deleccionar la parte Fc después de que la proteína de fusión haya sido expresada, detectada y purificada de la manera ventajosa descrita. Este es el caso en la que la porción Fc demuestra ser un impedimento para su uso en terapia y en diagnóstico, por ejemplo, cuando la proteína de fusión se va a utilizar para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, se han condensado proteínas humanas, tales como hIL5, con porciones Fc para conseguir ensayos de selección de alta capacidad de procesamiento para identificar antagonistas de hIL-5. Véase Bennett *et al.*, Journal of Molecular Recognition, 8:52-58 (1995), y Johanson *et al.*, The Journal of Biological Chemistry, 270 (16): 9459-9471 (1995).

Los polipéptidos de CD74-ROS pueden recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes mediante métodos muy conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácidos, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina. Lo más preferiblemente, se emplea la cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación. Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos naturalmente purificados, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes procedentes de un hospedante procarionota o eucariota que incluyen, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insecto y de mamífero. Dependiendo del hospedante empleado en el procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o no glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedante.

Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un método para producir un polipéptido de fusión de CD74-ROS recombinante mediante el cultivo de una célula hospedante recombinante (tal como se describió anteriormente) bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de fusión, y recuperar el polipéptido. Las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento de células hospedantes y la expresión de polipéptidos recombinantes a partir de dichas células son muy conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel FM *et al.*, eds., volumen 2, capítulo 16, Wiley Interscience.

20 D. Polipéptidos aislados

La invención también proporciona, en parte, polipéptidos de fusión de CD74-ROS aislados y sus fragmentos. En una realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1; (b) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal de CD74 (restos 1-208 de SEQ ID NO:3) y el dominio quinasa de ROS (restos 1945-2222 of SEQ ID NO:5); y (c) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido que comprende al menos seis aminoácidos contiguos que incluyen la zona de unión de la fusión (restos 208-209 de SEQ ID NO:1, o restos 208-209 of SEQ ID NO:3) de un polipéptido de fusión de CD74-ROS.

En una realización preferida, la invención proporciona un polipéptido de fusión de CD74-ROS aislado que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc depositado descrito anteriormente (ATCC n.º de depósito ***-****). En otra realización preferida, se proporcionan polipéptidos mutantes recombinantes de la invención, que pueden producirse empleando un vector recombinante o una célula hospedante recombinante, tal como se describió anteriormente.

En la técnica se reconoce que algunas secuencias de aminoácidos de un polipéptido de fusión de CD74-ROS pueden variar sin afectar significativamente a la estructura o la función de la proteína mutante. Si se contemplan estas diferencias en la secuencias, no debe olvidarse que existirán áreas críticas sobre la proteína que determinan la actividad (por ejemplo, el dominio quinasa de ROS). En general, es posible reemplazar restos que forman la estructura terciaria, con la condición de que se empleen restos que realicen una función similar. En otros casos, el tipo de resto puede carecer totalmente de importancia si la alteración se produce en una región no crítica de la proteína.

Así, la invención incluye además variaciones de un polipéptido de fusión de CD74-ROS que muestra una actividad ROS quinasa sustancial o que incluye regiones de las proteínas de CD74 y ROS, tal como las porciones de proteínas analizadas a continuación. Estos mutantes incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones, y sustituciones según el tipo (por ejemplo, se sustituye un resto hidrófilo por otro, pero por regla no se sustituye un resto muy hidrófilo por otro muy hidrófobo). Los pequeños cambios o estas sustituciones de aminoácidos "neutras" en general tendrán poco efecto sobre la actividad.

Generalmente se consideran sustituciones conservadoras las sustituciones que se realizan entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Ile; el intercambio de los restos hidroxílicos Ser y Thr, el intercambio de los restos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los restos amídicos Asn y Gln, el intercambio de los restos básicos Lys y Arg, y las sustituciones entre los restos aromáticos Phe, Tyr. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservadoras conocidas por los expertos en la técnica son: Aromáticos: fenilalanina triptófano tirosina; Hidrófobos: leucina isoleucina valina; Polares: glutamina asparaginas; Básicos: arginina lisina histidina; Ácidos: ácido aspártico ácido glutámico; Pequeños: alanina serina treonina metionina glicina. Tal como se indicó en detalle anteriormente, pueden encontrarse más indicaciones acerca de cuáles son los cambios en los aminoácidos que es probable que sean fenotípicamente silenciosos (es decir, no es probable que tengan un efecto perjudicial sobre una función) en Bowie *et al.*, Science 247, supra.

Los polipéptidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en forma aislada, y preferiblemente están sustancialmente purificados. Una versión producida de modo recombinante de un polipéptido de fusión de CD74-

ROS de la invención puede purificarse sustancialmente mediante el método de una etapa descrito en Smith y Johnson, Gene, 67:31-40 (1988).

Los polipéptidos de la presente invención incluyen los polipéptidos de fusión de CD74-ROS de la figura 2 (SEQ ID NO:1) (tanto si incluyen una secuencia conductora como si no), el polipéptido de fusión codificado por el clon de ADNc depositado (ATCC n.º ***_****), una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal de CD74 (restos 1-208 de SEQ ID NO:5) y el dominio quinasa de ROS (restos 1945-2222 of SEQ ID NO:7), y una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido que comprende al menos seis aminoácidos contiguos que incluyen la zona de unión de la fusión (restos 208-209 de SEQ ID NO:1) de un polipéptido de fusión de CD74-ROS, así como polipéptidos que tengan una similitud de al menos 90%, más preferiblemente una similitud de al menos 95%, y aún más preferiblemente una similitud de al menos 96%, 97%, 98% o 99% con los descritos anteriormente.

Un "porcentaje de similitud" para dos polipéptidos significa una puntuación de similitud producida comparando las secuencias de aminoácidos de los dos polipéptidos empleando el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) y los ajustes por defecto para determinar la similitud. El programa Bestfit emplea el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Advances in Applied Mathematics, 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de similitud entre dos secuencias.

Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de referencia de un polipéptido de ROS mutante de la invención significa que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia del polipéptido puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia del polipéptido de fusión de CD74-ROS. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 5% de los restos aminoácidos en la secuencia de referencia pueden estar delecionados o sustituidos por otro aminoácido, o una serie de aminoácidos hasta 5% de los restos aminoácidos totales en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden aparecer en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier punto entre estas posiciones terminales, intercaladas de modo individual entre los restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Cuando se emplea Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia concreta es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se ajustan, por supuesto, de modo que se calcula el porcentaje de identidad a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia y se permitan huecos en la homología de hasta 5% del número total de restos aminoácidos en la secuencia de referencia.

Un polipéptido de fusión de CD74-ROS de la presente invención puede utilizarse como marcador de peso molecular en geles de SDS-PAGE o en columnas de filtración en gel de tamices moleculares, por ejemplo, empleando métodos muy conocidos por los expertos en la técnica.

Tal como se describe con más detalle a continuación, los polipéptidos de la presente invención también pueden utilizarse para generar reactivos específicos del polipéptido de fusión, tales como anticuerpos policlonales y monoclonales, que son útiles en ensayos para detectar la expresión del polipéptido de ROS mutante según se describe a continuación, o como agonistas o antagonistas capaces de potenciar o inhibir la función/actividad de la proteína de ROS mutante. Además, estos polipéptidos pueden utilizarse en el sistema de dos híbridos de levaduras para "capturar" las proteínas de unión al polipéptido de fusión de CD74-ROS, que también son agonistas y antagonistas candidatos según la presente invención. El sistema de dos híbridos de levaduras se describe en Fields y Song, Nature, 340:245-246 (1989).

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido o un polipéptido que comprende una porción que porta un epitopo de un polipéptido de la invención, concretamente un epitopo que comprende la zona de unión de la fusión de un variante del polipéptido de fusión de CD74-ROS. El epitopo de esta porción del polipéptido es un epitopo inmunogénico o antigénico de un polipéptido de la invención. Un "epitopo inmunogénico" se define como una parte de una proteína que suscita una respuesta de anticuerpos cuando la proteína completa es el inmunógeno. Se cree que estos epitopos inmunogénicos están limitados a unos pocos loci sobre la molécula. Por otra parte, una región de una molécula de proteína a la cual puede unirse un anticuerpo se define como un "epitopo antigénico." El número de epitopos antigénicos de una proteína en general es menor que el número de epitopos inmunogénicos. Véase, por ejemplo, Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002 (1983). La producción de anticuerpos específicos del polipéptido de fusión de la invención se describe con más detalle a continuación.

Los anticuerpos generados mediante los polipéptidos o los péptidos que portan epitopos antigénicos son útiles para detectar una proteína imitada, y pueden emplearse anticuerpos contra diferentes péptidos para seguir el destino de diversas regiones de un precursor de proteína que sufre un procesamiento postraduccional. Los péptidos y los anticuerpos antipéptido pueden emplearse en una diversidad de ensayos cualitativos o cuantitativos para el proteína

imitada, por ejemplo, en ensayos de competición, puesto que se ha demostrado que pueden unirse incluso péptidos cortos (por ejemplo, aproximadamente 9 aminoácidos) y desplazar a los péptidos más grandes en ensayos de inmunoprecipitación. Véase, por ejemplo, Wilson *et al.*, Cell, 37:767-778 (1984) en 777. Los anticuerpos antipéptido de la invención también son útiles para la purificación de la proteína imitada, por ejemplo, mediante una cromatografía de adsorción empleando métodos muy conocidos en la técnica. Los formatos de ensayos inmunológicos se describen con más detalle a continuación.

Los polipéptidos de ROS quinasa mutante recombinantes también están dentro del alcance de la presente invención, y pueden producirse empleando polinucleótidos de fusión de la invención, tal como se describe en la anterior sección B. Por ejemplo, la invención proporciona un método para producir un polipéptido de fusión de CD74-ROS recombinante mediante el cultivo de una célula hospedante recombinante (tal como se describió anteriormente) bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de fusión, y recuperar el polipéptido. Las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento de células hospedantes y la expresión de polipéptidos recombinantes a partir de dichas células son muy conocidas por los expertos en la técnica.

E. Reactivos específicos de mutante

Los reactivos específicos del polipéptido de ROS mutante útiles en la práctica de los métodos descritos incluyen, entre otros, anticuerpos específicos del polipéptido de fusión y péptidos AQUA (péptidos marcados con isótopos pesados) que se corresponden con la expresión del polipéptido de fusión de CD74-ROS y son adecuados para su detección y cuantificación en una muestra biológica. Un reactivo específico de un polipéptido de fusión es cualquier reactivo biológico o químico capaz de unirse específicamente, detectar y/o cuantificar la presencia/nivel del polipéptido de fusión de CD74-ROS expresado en una muestra biológica. La expresión incluye, pero no se limita al anticuerpo preferido y los reactivos de péptidos AQUA analizados a continuación, y los reactivos equivalentes están dentro del alcance de la presente invención.

Anticuerpos

Los reactivos adecuados para su uso en la práctica de los métodos de la invención incluyen un anticuerpo específico del polipéptido de fusión de CD74-ROS. Un anticuerpo específico de la fusión de la invención es un anticuerpo o anticuerpos aislados que se unen específicamente a un polipéptido de fusión de CD74-ROS de la invención (por ejemplo, SEQ ID NO:1), pero que no se une sustancialmente a CD74 de tipo salvaje o ROS de tipo salvaje. Otros reactivos adecuados incluyen anticuerpos específicos de epitopo que se unen específicamente a un epitopo en el dominio extracelular de una secuencia de proteína de ROS de tipo salvaje (este dominio no está presente en la ROS quinasa truncada descrita en la presente) y, por tanto, son capaces de detectar la presencia (o ausencia) de ROS de tipo salvaje en una muestra.

Los anticuerpos específicos del polipéptido de fusión de CD74-ROS humano también pueden unirse a secuencias peptídicas epitópicas equivalentes y altamente homólogas en otras especies de mamífero, por ejemplo, especies murinas o de conejo, y viceversa. Los anticuerpos útiles en la práctica de los métodos de la invención incluyen (a) anticuerpos monoclonales, (b) anticuerpos policlonales purificados que se unen específicamente al polipéptido diana (por ejemplo, la zona de unión de la fusión del polipéptido de fusión de CD74-ROS, (c) anticuerpos según se describió en (a)-(b) anteriormente que se unen a epitopos equivalentes y altamente homólogos o sitios de fosforilación en otras especies no humanas (por ejemplo, ratón, rata), y (d) fragmentos de los anteriores (a)-(c) que se unen al antígeno (o más preferiblemente al epitopo) unido por los ejemplos de anticuerpos descritos en la presente.

Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos", tal como se emplean en la presente se refieren a todos los tipos de inmunoglobulinas, que incluyen IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser de cualquier especie de origen que incluye (por ejemplo) ratón, rata, conejo, caballo o humano, o pueden ser anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, M. Walker *et al.*, Molec. Immunol., 26:403-411 (1989); Morrision *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 81:6851 (1984); Neuberger *et al.*, Nature, 312:604 (1984). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes producidos según los métodos descritos en la patente de EEUU n.º 4.474.893 (Reading) o la patente de EEUU n.º 4.816.567 (Cabilly *et al.*). Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos específicos construidos de modo químico según el método descrito en la patente de EEUU n.º 4.676.980 (Segel *et al.*)

El sitio epitópico preferido de un anticuerpo específico de un polipéptido de fusión de CD74-ROS de la invención es un fragmento peptídico que consiste fundamentalmente en aproximadamente 11 a 17 aminoácidos de una secuencia de un polipéptido de fusión de CD74-ROS humano (SEQ ID NO:1) y dicho fragmentos incluyen la zona de unión de la fusión (que aparece en el resto 208 en el primer y segundo variante de la proteína de fusión (véase la figura 1 (panel C) y la figura 7 (panel inferior)). Se apreciará que los anticuerpos que se unen específicamente a péptidos/epitopos más cortos o más largos que incluyan la zona de unión de la fusión de un polipéptido de fusión de CD74-ROS están dentro del alcance de la presente invención.

La invención no se limita al uso de anticuerpos, sino que incluye moléculas equivalentes, tales como dominios de unión a proteínas o aptámeros de ácidos nucleicos, que se unen, de una manera específica de la proteína de fusión

o de la proteína truncada, fundamentalmente al mismo epitopo al cual se une un anticuerpo específico del polipéptido de fusión de CD74-ROS o un anticuerpo específico del epitopo del punto de truncamiento de ROS útil en los métodos de la invención. Véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature, 312:604 (1984). Estos reactivos equivalentes que no son anticuerpos pueden emplearse de modo adecuado en los métodos de la invención que se describen más a fondo a continuación.

Los anticuerpos policlonales útiles en la práctica de los métodos de la invención pueden producirse según técnicas convencionales mediante la inmunización de un animal adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, etc.) con un antígeno que incluya un epitopo específico de la proteína de fusión deseado (por ejemplo, la zona de unión de la fusión), la recolección de suero inmunológico del animal, y la separación de los anticuerpos policlonales del suero inmunológico, y la purificación de los anticuerpos policlonales que tengan la especificidad deseada, según procedimientos conocidos. El antígeno puede ser un antígeno peptídico sintético que comprenda la secuencia epitópica deseada, seleccionado y construido según técnicas muy conocidas. Véase, por ejemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, capítulo 5, p. 75-76, Harlow & Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Czernik, Methods In Enzymology, 201:264-283 (1991); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:21-49 (1962)). Los anticuerpos policlonales producidos tal como se describe en la presente pueden seleccionarse y aislarse tal como se describe más a fondo a continuación.

Los anticuerpos monoclonales también pueden emplearse de modo beneficioso en los métodos de la invención, y pueden producirse en líneas celulares de hibridoma según la técnica muy conocida de Kohler y Milstein, Nature, 265:495-497 (1975); Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511 (1976); véase también, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel *et al.* eds. (1989). Los anticuerpos monoclonales producidos de esta manera son muy específicos y mejoran la selectividad y la especificidad de los métodos de ensayo proporcionados por la invención. Por ejemplo, una disolución que contenga el antígeno apropiado (por ejemplo, un péptido sintético que comprende la zona de unión de la fusión de un polipéptido de fusión de CD74-ROS) puede inyectarse en un ratón y, después de un tiempo suficiente (según las técnicas convencionales), el ratón se sacrifica y se obtienen las células del bazo. Las células del bazo después se immortalizan mediante su fusión con células de mieloma, generalmente en presencia de polietilenglicol, para producir células de hibridoma. Pueden producirse hibridomas de fusión de conejo, por ejemplo, según se describe en la patente de EEUU n.º 5.675.063, C. Knight, otorgada el 7 de octubre, 1997. Las células de hibridoma después se cultivan en un medio de selección adecuado, tal como hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), y el sobrenadante se selecciona para anticuerpos monoclonales que tengan la especificidad deseada, tal como se describe a continuación. El anticuerpo segregado puede recuperarse del sobrenadante del cultivo de tejido por métodos convencionales, tales como precipitación, intercambio iónico o cromatografía de afinidad, o similares.

También pueden producirse fragmentos Fab monoclonales en *Escherichia coli* mediante técnicas recombinantes conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, W. Huse, Science, 246:1275-1281 (1989); Mullinax *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci., 87:8095 (1990). Si se prefieren los anticuerpos monoclonales de un isotipo para una aplicación concreta, los isotipos concretos pueden prepararse directamente, seleccionando a partir de la fusión inicial, o prepararse secundariamente, a partir de un hibridoma parental que segrega un anticuerpo monoclonal de un isotipo diferente empleando la técnica de selección de descendientes para aislar variantes de cambio de clase (Steplewski, *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 82:8653 (1985); Spira *et al.*, J. Immunol. Methods, 74:307 (1984). El sitio de combinación con el antígeno del anticuerpo monoclonal puede clonarse mediante PCR y producirse anticuerpos monocatenarios como anticuerpos recombinantes de presentación de fagos o anticuerpos solubles en *E. coli* (véase, por ejemplo, ANTIBODY ENGINEERING PROTOCOLS, 1995, Humana Press, Sudhir Paul editor)

Además, la patente de EEUU n.º 5.194.392, Geysen (1990), describe un método general para detectar o determinar la secuencia de monómeros (aminoácidos u otros compuestos) que es un equivalente topológico del epitopo (es decir, un "mimotopo") que es complementario con un paratopo (sitio de unión al antígeno) concreto de un anticuerpo de interés. Más en general, este método implica detectar o determinar una secuencia de monómeros que sea un equivalente topográfico de un ligando que es complementario con el sitio de unión al ligando de un receptor concreto de interés. De modo similar, la patente de EEUU n.º 5.480.971, Houghten *et al.* (1996), describe oligopéptidos peralquilados de C₁-C-alkilo lineales y conjuntos y bancos de dichos péptidos, así como métodos para utilizar dichos conjuntos y bancos de oligopéptidos para determinar la secuencia de un oligopéptido peralquilado que se une preferentemente a una molécula aceptora de interés. Así, también pueden prepararse análogos no peptídicos de los péptidos que portan el epitopo de la invención mediante estos métodos de modo convencional.

Los anticuerpos útiles en los métodos de la invención, tanto policlonales como monoclonales, pueden seleccionarse para la especificidad de epitopo y de proteína de fusión según técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Czernik *et al.*, Methods in Enzymology, 201:264-283 (1991). Por ejemplo, los anticuerpos pueden seleccionarse frente a un banco de péptidos mediante ELISA para asegurar la especificidad para el antígeno deseado y, si se desea, para la reactividad solo con un polipéptido de fusión de CD74-ROS de la invención y no con CD74 de tipo salvaje ni ROS de tipo salvaje. Los anticuerpos también pueden ensayarse mediante análisis de la transferencia Western frente a preparaciones celulares que contienen la proteína diana para confirmar la reactividad solo con la diana deseada y para asegurar que no se produce una unión apreciable con otras proteínas de fusión relacionadas con ROS. La producción, la selección y el uso de anticuerpos específicos de proteínas de fusión son conocidos por los expertos

en la técnica y ha sido descrito. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EEUU n.º 20050214301, Wetzel *et al.*, 29 de septiembre, 2005.

Los anticuerpos específicos del polipéptido de fusión útiles en los métodos de la invención pueden mostrar cierta reactividad cruzada limitada con epitopos de fusión similares en otras proteínas de fusión o con los epitopos en CD74 de tipo salvaje y ROS de tipo salvaje que forman la zona de unión de la fusión. Esto no resulta inesperado, puesto que la mayoría de los anticuerpos muestran un cierto grado de reactividad cruzada, y los anticuerpos antipeptídicos a menudo presentan reacción cruzada con epitopos que tengan una alta homología o identidad con el péptido inmunizante. Véase, por ejemplo, Czernik, *supra*. La reactividad cruzada con otras proteínas de fusión puede caracterizarse con facilidad mediante un análisis de la transferencia Western junto con marcadores de peso molecular conocido. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de reactividad cruzada pueden estudiarse para identificar los sitios altamente homólogos o idénticos a la secuencia del polipéptido de fusión de CD74-ROS con la que se une el anticuerpo. La reactividad cruzada no deseable puede eliminarse mediante una selección negativa realizando la purificación del anticuerpo en columnas de péptidos (por ejemplo, seleccionando los anticuerpos que se unen a CD74 de tipo salvaje y/o ROS de tipo salvaje).

Los anticuerpos específicos del polipéptido de fusión de CD74-ROS de la invención que son útiles para practicar los métodos descritos en la presente son específicos, de modo ideal, para un polipéptido de fusión humano, pero no se limitan a la unión a la especie humana, *per se*. La invención incluye la producción y el uso de anticuerpos que también se unen a epitopos conservados e idénticos o altamente homólogos en otras especies de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, mono). Las secuencias idénticas o altamente homólogas en otras especies pueden identificarse con facilidad mediante comparaciones de secuencias patrón, tal como el empleo de BLAST, con las secuencias del polipéptido de fusión de CD74-ROS humano descritas en la presente (SEQ ID NO:1).

Los anticuerpos empleados en los métodos de la invención también pueden caracterizarse y validarse para su uso en un formato de ensayo concreto, por ejemplo, FC, IHC, y/o ICC. El uso de anticuerpos específicos del polipéptido de fusión de CD74-ROS en estos métodos se describe más a fondo en la siguiente sección F. Los anticuerpos también pueden conjugarse, de forma ventajosa, con tintes fluorescentes (por ejemplo, Alexa488, PE), o marcadores, tales como puntos cuánticos, para su uso en análisis multiparamétricos, junto con otros anticuerpos de transducción de señales (fosfo-AKT, fosfo-Erk 1/2) y/o de marcadores celulares (citoqueratina), tal como se describe más fondo en la siguiente sección F.

En la práctica de los métodos de la invención, la expresión y/o actividad de CD74 de tipo salvaje y/o ROS de tipo salvaje en una muestra biológica concreta también puede estudiarse de modo ventajoso empleando anticuerpos (fosfoespecíficos o totales) para estas proteínas de tipo salvaje. Por ejemplo, están disponibles en el mercado anticuerpos específicos del sitio de fosforilación del receptor CSF (véase CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Beverly MA, 2005/06 n.º de catálogo 3151, 3155, y 3154; y Upstate Biotechnology, 2006 n.º de catálogo 06-457). Estos anticuerpos también pueden producirse según métodos convencionales, tal como se describió anteriormente. Las secuencias de aminoácidos de CD74 y ROS humanas están publicadas (véanse las figuras 3 y 4, y los n.ºs de registro de SwissProt referidos), así como las secuencias de estas proteínas de otras especies.

La detección de la expresión y/o activación de CD74 de tipo salvaje y ROS de tipo salvaje, junto con la expresión del polipéptido de fusión de CD74-ROS, en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de tumor) puede proporcionar información sobre si la proteína de fusión, por sí sola, está dirigiendo al tumor, o si ROS de tipo salvaje también está activada y dirigiendo al tumor. Esta información resulta clínicamente útil para evaluar si es más probable que el transporte dirigido de la proteína de fusión o la proteína o proteínas de tipo salvaje, o ambas, sea más beneficioso para inhibir el avance del tumor, y para seleccionar un producto terapéutico apropiado o una de sus combinaciones. Los anticuerpos específicos para el dominio extracelular de ROS quinasa de tipo salvaje, que no está presente en la ROS quinasa truncada descrita en la presente, puede ser particularmente útil para determinar la presencia/ausencia de la ROS quinasa mutante.

Se entenderá que puede utilizarse más de un anticuerpo en la práctica de los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, uno o más anticuerpos específicos del polipéptido de fusión de CD74-ROS, junto con uno o más anticuerpos específicos para otra quinasa, receptor o sustrato de quinasa que es sospechoso de estar activado, o que potencialmente está activado, en un cáncer en el que se expresa un polipéptido de fusión de CD74-ROS, pueden emplearse simultáneamente para detectar la actividad de estas otras moléculas de señalización en una muestra biológica que comprende células de dicho cáncer.

Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos de fusión de CD74-ROS de la presente invención y sus fragmentos que portan epitopos de la zona de unión de la fusión descritos anteriormente pueden combinarse con partes del dominio constante de inmunoglobulinas (IgG), produciendo polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una mayor semivida *in vivo*. Esto se ha demostrado, por ejemplo, para proteínas quiméricas que consisten en los primeros dos dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas humanas (documento EPA 394.827; Trauneker *et al.*, Nature, 331:84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen una estructura dimérica unida mediante enlace disulfuro debido a la parte IgG también pueden ser más eficaces para unirse y neutralizar otras

moléculas aparte de solo el polipéptido de fusión de CD74-ROS monomérico (Fountoulakis *et al.*, J. Biochem., 270:3958-3964 (1995)).

Péptidos marcados con isótopos pesados (péptidos AQUA)

5 Los reactivos específicos del polipéptido de fusión de CD74-ROS útiles en la práctica de los métodos descritos también pueden comprender péptidos marcados con isótopos pesados adecuados para la cuantificación absoluta del polipéptido de fusión de CD74-ROS expresado en una muestra biológica. Se ha descrito la producción y el uso de péptidos AQUA para la cuantificación absoluta de proteínas (AQUA) en mezclas complejas. Véase el documento WO/03016861, "Absolute Quantification of Proteins and Modified Forms Thereof by Multistage Mass Spectrometry," Gygi *et al.*, y también Gerber *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100:6940-6945 (2003) (cuyas enseñanzas se incorporan a la presente como referencia en su totalidad).

10 La metodología AQUA emplea la introducción de una cantidad conocida de al menos un patrón de un péptido marcado con un isótopo pesado (que tiene una firma exclusiva que puede detectarse mediante una cromatografía LC-SRM) en una muestra biológica digerida para determinar, mediante la comparación con el patrón de péptido, la cantidad absoluta de un péptido con la misma secuencia y modificación de proteína en la muestra biológica. Brevemente, la metodología AQUA tiene dos etapas: la selección y validación del patrón interno del péptido, y el desarrollo del método; y la aplicación empleando patrones internos de péptidos validados para detectar y cuantificar una proteína diana en una muestra. El método es una técnica poderosa para detectar y cuantificar un péptido/proteína concreto dentro de una mezcla biológica compleja, tal como un lisado de células, y puede emplearse, por ejemplo, para cuantificar el cambio en la fosforilación de proteínas que resulta del tratamiento con un fármaco, o para cuantificar diferencias en el nivel de una proteína en estados biológicos diferentes.

15 En general, para desarrollar un patrón interno adecuado, se elige un péptido concreto (o un péptido modificado) dentro de una secuencia de proteína diana basándose en su secuencia de aminoácidos y de la proteasa concreta que se va a utilizar para la digestión. Después se genera el péptido mediante una síntesis peptídica en fase sólida de modo que un resto es reemplazado por el mismo resto que contiene isótopos estables (^{13}C , ^{15}N). El resultado es un péptido que es químicamente idéntico a su homólogo nativo formado por proteólisis, pero que puede distinguirse con facilidad mediante MS a través de un desplazamiento de masas de 7-Da. El péptido de patrón interno AQUA recién sintetizado después se evalúa mediante LC-MS/MS. Este proceso proporciona información cualitativa acerca de la retención del péptido mediante cromatografía de fase inversa, eficacia de ionización, y fragmentación mediante disociación inducida por colisión. Se eligen los fragmentos de iones informativos y abundantes para conjuntos de péptidos de patrón interno y nativos, y después se controlan específicamente en sucesión rápida como una función de la retención cromatográfica para formar un método de control de reacción seleccionado (LC-SRM) basado en el perfil exclusivo del patrón de péptido.

20 La segunda etapa de la estrategia AQUA es su aplicación para medir la cantidad de una proteína o una proteína modificada en mezclas complejas. Los lisados de células completas generalmente se fraccionan mediante una electroforesis en gel de SDS-PAGE, y las regiones del gel coherentes con la migración de las proteínas se cortan y se retiran. A este proceso le sigue una proteólisis en gel en presencia de los péptidos AQUA y un análisis LC-SRM (véase Gerber *et al.*, *supra.*) Los péptidos AQUA se siembran en la mezcla de péptidos compleja obtenida mediante la digestión del lisado de células completas con una enzima proteolítica y se someten a una purificación por inmunofluorescencia tal como se describió anteriormente. El tiempo de retención y el patrón de fragmentación del péptido nativo formado mediante digestión (por ejemplo, tripsinización) es idéntico al del péptido de patrón interno AQUA determinado previamente; así, un análisis de LC-MS/MS empleando un experimento SRM resulta en una medición muy sensible y específica del patrón interno y del analito directamente a partir de mezclas de péptidos extremadamente complejas.

25 Puesto que se añade una cantidad absoluta del péptido AQUA (por ejemplo, 250 fmol), la proporción de las áreas bajo la curva puede utilizarse para determinar los niveles de expresión precisos de una proteína o una forma fosforilada de una proteína en el lisado de células original. Además, el patrón interno está presente durante la digestión en gel a medida que se forman los péptidos nativos, de modo que la eficacia de la extracción de los péptidos de los trozos de gel, las pérdidas absolutas durante la manipulación de la muestra (incluyendo la centrifugación al vacío), y la variabilidad durante la introducción en el sistema LC-MS no afecta a la proporción determinada de abundancias del péptido nativo y péptido AQUA.

30 Se desarrolla un patrón de péptido AQUA para una secuencia conocida previamente identificada mediante el método IAP-LC-MS/MS dentro de una proteína diana. Si el sitio se modifica, puede desarrollarse un péptido AQUA que incorpore la forma modificada del resto concreto dentro del sitio, y puede desarrollarse un segundo péptido AQUA que incorpore la forma no modificada del resto. De esta forma, los dos patrones pueden emplearse para detectar y cuantificar las formas modificadas y no modificadas del sitio en una muestra biológica.

35 También pueden generarse patrones internos de péptidos estudiando la secuencia de aminoácidos primaria de una proteína y determinando los límites de los péptidos producidos mediante ruptura con proteasas. Como alternativa, una proteína puede digerirse realmente con una proteasa y después puede secuenciarse un fragmento peptídico concreto producido. Las proteasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a serina proteasas (por ejemplo, tripsina,

hepsina), metaloproteasas (por ejemplo, PUMP1), quimotripsina, catepsina, pepsina, termolisina, carboxipeptidasas, etc.

Se selecciona una secuencia peptídica dentro de una proteína diana según uno o más criterios para optimizar el uso del péptido como patrón interno. Preferiblemente, el tamaño del péptido se selecciona para minimizar las probabilidades de que la secuencia peptídica se repita en otro punto en otras proteínas que no son la diana. Así, un péptido tiene preferiblemente al menos aproximadamente 6 aminoácidos. El tamaño del péptido también se optimiza para maximizar la frecuencia de ionización. Así, no se prefieren los péptidos más largos que aproximadamente 20 aminoácidos. El intervalo preferido es de aproximadamente 7 a 15 aminoácidos. También se selecciona la secuencia del péptido que no es probable que sea químicamente reactiva durante la espectrometría de masas, y así se evitan secuencias que comprendan cisteína, triptófano o metionina.

Puede seleccionarse una secuencia peptídica que no incluya una región modificada de la región diana, de modo que el patrón interno de péptido puede utilizarse para determinar la cantidad de todas las formas de la proteína. Como alternativa, un patrón interno de péptido que incluya un aminoácido modificado puede ser deseable para detectar y cuantificar solo la forma modificada de la proteína diana. Los patrones de péptidos para las regiones modificadas y no modificadas pueden utilizarse juntos, para determinar el grado de modificación en una muestra concreta (es decir, para determinar cuál es la fracción de la cantidad total de proteína que está representada por la forma modificada). Por ejemplo, pueden utilizarse patrones de péptidos para la forma fosforilada y no fosforilada de una proteína que se sabe que está fosforilada en un sitio concreto, para cuantificar la cantidad de forma fosforilada en una muestra.

El péptido se marca empleando uno o más aminoácidos marcados (es decir, el marcador es una parte real del péptido) o, menos preferiblemente, los marcadores pueden unirse después de la síntesis según métodos convencionales. Preferiblemente, el marcador es un marcador que altera la masa basándose en las siguientes consideraciones: la masa debe ser exclusiva para las masas de los fragmentos de desplazamiento producidos mediante el análisis MS con regiones del espectro con bajo fondo; el componente de firma de masas iónicas es la porción del resto marcador que preferiblemente muestra una firma de masa iónica exclusiva en el análisis MS; la suma de las masas de los átomos constituyentes del marcador preferiblemente es exclusivamente diferente de los fragmentos de todos los posibles aminoácidos. Como resultado, los péptidos y aminoácidos marcados pueden distinguirse con facilidad de los no marcados por el patrón de iones/masas en el espectro de masas resultante. Preferiblemente, el componente de firma de masas iónicas imparte una masa a un fragmento de proteína que no se corresponde con la masa del resto para ninguno de los 20 aminoácidos naturales.

El marcador debe ser robusto bajo las condiciones de fragmentación de MS y no sufrir una fragmentación desfavorable. La química de marcaje debe ser eficaz bajo una serie de condiciones, en particular condiciones desnaturalizantes, y el marcador marcado preferiblemente permanece soluble en el sistema de tampón de MS elegido. El marcador preferiblemente no suprime la eficacia de ionización de la proteína y no es químicamente reactivo. El marcador puede contener una mezcla de dos o más especies isotópicamente diferenciadas para generar un patrón espectrométrico de masas exclusivo en cada posición del fragmento marcada. Los isótopos estables, tales como ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , o ^{34}S , están entre los marcadores preferidos. También pueden prepararse parejas de patrones internos de péptidos que incorporen un marcador de isótopo diferente. Los restos aminoácidos preferidos en los que puede incorporarse un marcador de isótopo pesado incluyen leucina, prolina, valina, y fenilalanina.

Los patrones internos de péptidos se caracterizan según su proporción de masa a carga (m/z) y, preferiblemente, también según su tiempo de retención en una columna cromatográfica (por ejemplo, una columna de HPLC). Los patrones internos que coeluyen con péptidos no marcados de secuencia idéntica se seleccionan como los patrones internos óptimos. El patrón interno después se analiza mediante la fragmentación del péptido por cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante disociación inducida por colisión (CID) empleando, por ejemplo, argón o helio como gas de colisión. Los fragmentos después se analizan, por ejemplo, mediante una espectrometría de masas de múltiples etapas (MS^n) para obtener un espectro iónico del fragmento, para obtener una firma de fragmentación del péptido. Preferiblemente, los fragmentos peptídicos tienen diferencias significativas en las proporciones de m/z para que los picos que se corresponden con cada fragmento estén bien separados, y se obtiene una firma que es exclusiva para el péptido diana. Si no se obtiene una firma del fragmento adecuada en la primera etapa se realizan más etapas de la MS hasta que se obtenga una firma exclusiva.

Los iones del fragmento en los espectros de MS/MS y MS^3 generalmente son muy específicos para el péptido de interés y, junto con los métodos de LC, permiten un medio muy selectivo para detectar y cuantificar un péptido/proteína diana en una mezcla de proteínas compleja, tal como un lisado de células, que contiene muchos miles o decenas de miles de proteínas. Puede ensayarse cualquier muestra biológica que contenga potencialmente una proteína/péptido diana de interés. Preferiblemente se emplean extractos de células brutos o parcialmente purificados. En general, la muestra contiene al menos 0,01 mg de proteínas, generalmente una concentración de 0,1-10 mg/ml, y puede ajustarse a un pH y concentración del tampón deseados.

Después se añade una cantidad conocida de un patrón interno de péptido marcado, preferiblemente aproximadamente 10 femtomoles, que se corresponde con una proteína diana que va a detectarse/cuantificarse, a una muestra biológica, tal como un lisado de células. La muestra sembrada después se digiere con una o más

proteasas durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la digestión. Después se realiza una separación (por ejemplo, mediante HPLC, HPLC en fase inversa, electroforesis capilar, cromatografía de intercambio iónico, etc.) para aislar el patrón interno marcado y su correspondiente péptido diana de los otros péptidos en la muestra. La LC microcapilar es un método preferido.

- 5 Cada péptido aislado después se estudia controlando una reacción seleccionada en la MS. Esto implica emplear el conocimiento previo adquirido mediante la caracterización del patrón interno de péptido y después dejando que la MS controle continuamente un ion específico en el espectro de MS/MS o MSⁿ para el péptido de interés y el patrón interno. Después de la elución se calcula el área bajo la curva (AUC) para los picos del patrón del péptido y del péptido diana. La proporción de las dos áreas proporciona la cuantificación absoluta que puede normalizarse para el número de células empleado en el análisis y el peso molecular de la proteína, para proporcionar el número preciso de copias de la proteína por célula. Otros detalles de la metodología AQUA se describen en Gygi *et al.*, y Gerber *et al. supra*.

- 15 Pueden producirse, de modo deseable, patrones de péptidos internos AQUA (péptidos marcados con isótopos pesados), tal como se describió anteriormente, para detectar y cuantificar cualquier sitio exclusivo (por ejemplo, la zona de unión de la fusión dentro de un polipéptido de fusión de CD74-ROS) dentro de un polipéptido de ROS mutante de la invención. Por ejemplo, puede prepararse un fosfopéptido AQUA que se corresponda con la secuencia de la zona de unión de la fusión del polipéptido de fusión de CD74-ROS. Pueden producirse patrones de péptidos para la zona de unión de la fusión de CD74-ROS, y estos patrones pueden emplearse en la metodología AQUA para detectar y cuantificar la zona de unión de la fusión (es decir, la presencia del polipéptido de fusión de CD74-ROS) en una muestra biológica.

- 20 Por ejemplo, un ejemplo de un péptido AQUA de la invención comprende la secuencia de aminoácidos LVGDDF, que se corresponde con los tres aminoácidos que flanquean inmediatamente cada lado de la zona de unión de la fusión en el segundo variante (corto) del polipéptido de fusión de CD74-ROS. Se apreciará que también pueden construirse péptidos AQUA más grandes que comprendan la secuencia de la zona de unión de la fusión (y restos adicionales cadena abajo o arriba de esa). De modo similar, puede construirse, como alternativa, un péptido AQUA más pequeño que comprenda menos de todos los restos de dicha secuencia (pero que comprenda el punto de la zona de unión de la fusión en sí mismo). Estos péptidos AQUA más grandes o más pequeños están dentro del alcance de la presente invención, y la selección y producción de péptidos AQUA preferidos puede realizarse como se describió anteriormente (véase Gygi *et al.*, Gerber *et al.*, *supra*).

- 30 Sondas de ácidos nucleicos

Los reactivos específicos de fusión proporcionados por la invención también incluyen sondas y cebadores de ácidos nucleicos adecuados para la detección de un polinucleótido de CD74-ROS, según se describió con más detalle en la anterior sección B. El uso específico de dichas sondas en ensayos, tales como una hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) o una amplificación mediante PCR, se describe en la siguiente sección F.

- 35 La invención también proporciona un kit para la detección de un polipéptido y/o polinucleótido de fusión de CD74-ROS en una muestra biológica, y el kit comprende al menos un reactivo específico del polipéptido o polinucleótido de fusión de la invención, y uno o más reactivos secundarios. Los reactivos secundarios adecuados para su empleo en un kit son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, como ejemplo, tampones, sondas o anticuerpos secundarios detectables, quinasas, agentes activantes, sustratos de quinasa y similares.

- 40 **F. Aplicaciones de diagnóstico y formatos de ensayo**

Los métodos de la invención pueden realizarse en una diversidad de diferentes formatos de ensayo conocidos por los expertos en la técnica.

Inmunoensayos

- 45 Los inmunoensayos útiles en la práctica de los métodos de la invención pueden ser inmunoensayos homogéneos o inmunoensayos heterogéneos. En un ensayo homogéneo, la reacción inmunológica normalmente implica un reactivo específico de un polipéptido de ROS mutante (por ejemplo, un anticuerpo específico de un polipéptido de fusión de CD74-ROS), un analito marcado, y la muestra biológica de interés. La señal que surge del marcador se modifica, directa o indirectamente, después de la unión del anticuerpo al analito marcado. La reacción inmunológica y la detección del grado de esta se realizan en una disolución homogénea. Los marcadores inmunoquímicos que pueden emplearse incluyen radicales libres, radioisótopos, tintes fluorescentes, enzimas, bacteriófagos, coenzimas, etc.
- 50 También pueden emplearse de modo ventajoso marcadores de nanocristales semiconductores, o "puntos cuánticos", y su preparación y uso han sido bien descritos. Véase, en general, K. Barovsky, *Nanotech. Law & Bus.*, 1 (2): artículo 14 (2004) y las patentes citadas en ese documento.

- 55 En una estrategia de ensayo heterogéneo, los reactivos son habitualmente la muestra biológica, un reactivo específico del polipéptido de ROS quinasa mutante (por ejemplo, un anticuerpo), y un medio adecuado para producir una señal detectable. Pueden emplearse las muestras biológicas tal como se describe más a fondo a continuación. El anticuerpo en general se inmoviliza sobre un soporte, tal como una esfera, una placa o un portaobjetos, y se pone

- en contacto con la muestra sospechosa de contener el antígeno en una fase líquida. El soporte después se separa de la fase líquida, y la fase del soporte o la fase líquida se estudia para descubrir una señal detectable empleando un medio para producir dicha señal. La señal se relaciona con la presencia del analito en la muestra biológica. El medio para producir una señal detectable incluye el uso de marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, puntos cuánticos, etc. Por ejemplo, si el antígeno que se va a detectar contiene un segundo sitio de unión, un anticuerpo que se une a ese sitio puede conjugarse con un grupo detectable y añadirse a la disolución de reacción en fase líquida antes de la etapa de separación. La presencia del grupo detectable sobre el soporte sólido indica la presencia del antígeno en la muestra de ensayo. Los ejemplos de inmunoensayos adecuados son el radioinmunoensayo, métodos de inmunofluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas y similares.
- Los formatos de inmunoensayos y sus variaciones, que pueden ser útiles para realizar los métodos descritos en la presente, son muy conocidos en la técnica. Véase, en general, E. Maggio, *Enzyme-Immunoassay* (1980) (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.); véase también la patente de EEUU n.º 4.727.022 (Skold *et al.*, "Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application"); la patente de EEUU n.º 4.659.678 (Forrest *et al.*, "Immunoassay of Antigens"); la patente de EEUU n.º 4.376.110 (David *et al.*, "Immunometric Assays Using Monoclonal Antibodies"). Las condiciones adecuadas para la formación de complejos de reactivo-anticuerpo son muy conocidas por los expertos en la técnica. Véase *id.* Los anticuerpos monoclonales específicos del polipéptido de fusión de CD74-ROS pueden emplearse en un ensayo de "dos sitios" o "sandwich", con una única línea celular de hibridoma como fuente del anticuerpo monoclonal marcado y del anticuerpo monoclonal unido. Estos ensayos se describen en la patente de EEUU n.º 4.376.110. La concentración del reactivo detectable debe ser suficiente para que la unión del polipéptido de fusión de CD74-ROS sea detectable, comparado con el fondo.
- Los anticuerpos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente pueden conjugarse con un soporte sólido adecuado para un ensayo de diagnóstico (por ejemplo, esferas, placas, portaobjetos o pocillos formados por materiales tales como látex o poliestireno) según técnicas conocidas, tales como precipitación. Los anticuerpos u otros reactivos de unión al polipéptido de fusión de CD74-ROS también pueden conjugarse, de modo similar, con grupos detectables, tales como radiomarcadores (por ejemplo, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina), y marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína) según técnicas conocidas.
- Los ensayos basados en células, tales como la citometría de flujo (FC), la inmunohistoquímica (IHC), o la inmunofluorescencia (IF), son particularmente deseables para practicar los métodos de la invención, puesto que dichos formatos de ensayo son clínicamente adecuados, permiten la detección de la expresión del polipéptido de ROS mutante *in vivo*, y evitan el riesgo de cambios accidentales en la actividad como resultado de la manipulación de células obtenidas, por ejemplo, de una muestra de tumor para obtener extractos. Por consiguiente, en algunas realizaciones preferidas, los métodos de la invención se aplican en un formato de ensayo de citometría de flujo (FC), inmunohistoquímica (IHC), o inmunofluorescencia (IF).
- La citometría de flujo (FC) puede emplearse para determinar la expresión de un polipéptido de ROS mutante en un tumor de mamífero antes, durante y después del tratamiento con un fármaco dirigido a la inhibición de la actividad ROS quinasa. Por ejemplo, células tumorales procedentes de un aspirado con aguja fina pueden analizarse mediante citometría de flujo para la expresión y/o la activación del polipéptido de fusión de CD74-ROS, así como para marcadores que identifican tipos celulares de cáncer, etc., si se desea. La citometría de flujo puede realizarse según métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Chow *et al.*, *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*, 46:72-78 (2001). Brevemente y como ejemplo, puede emplearse el siguiente protocolo para el análisis citométrico: fijación de las células con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos a 37 °C, seguido por una permeabilización en metanol al 90% f0 minutos en hielo. Las células después pueden teñirse con el anticuerpo primario específico del polipéptido de fusión de CD74-ROS, lavarse y marcarse con un anticuerpo secundario marcado fluorescente. Las células después se analizan en un citómetro de flujo (por ejemplo, un Beckman Coulter FC500) según los protocolos específicos del instrumento empleado. Estos análisis identifican el nivel del polipéptido de fusión de CD74-ROS expresado en el tumor. Un análisis similar después del tratamiento del tumor con un producto terapéutico inhibidor de ROS revelará la capacidad de respuesta de un tumor que expresa el polipéptido de fusión de CD74-ROS frente al inhibidor dirigido de la ROS quinasa.
- También puede emplearse la tinción inmunohistoquímica (IHC) para determinar el estado de expresión y/o activación de un polipéptido de ROS quinasa mutante en un cáncer de mamífero (por ejemplo, NSCLC) antes, durante y después de un tratamiento con un fármaco dirigido a la inhibición de la actividad ROS quinasa. La IHC puede realizarse según técnicas muy conocidas. Véase, por ejemplo, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, capítulo 10, Harlow & Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988). Brevemente y como ejemplo, se prepara tejido introducido en parafina (por ejemplo, un tejido tumoral procedente de una biopsia) para una tinción inmunohistoquímica desparafinando secciones de tejido con xileno, seguido de etanol; hidratando en agua y después en PBS; revelando el antígeno mediante el calentamiento del portaobjetos en tampón citrato de sodio; incubando secciones en peróxido de hidrógeno; bloqueando en disolución de bloqueo; incubando el portaobjetos en anticuerpo primario anti-polipéptido de fusión de CD74-ROS y anticuerpo secundario; y, por último, realizando la detección mediante el empleo de un método de ABC de avidina/biotina según las instrucciones del fabricante.

- También pueden emplearse ensayos de inmunofluorescencia (IF) para determinar el estado de expresión y/o activación de un polipéptido de fusión de CD74-ROS en un cáncer de mamífero antes, durante y después de un tratamiento con un fármaco dirigido a la inhibición de la actividad ROS quinasa. La IF puede realizarse según técnicas muy conocidas. Véase, por ejemplo, J.M. Polak y S. Van Noorden (1997), INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY, 2ª ed.; ROYAL MICROSCOPY SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK, 37, BioScientific/Springer-Verlag. Brevemente y como ejemplo, pueden fijarse muestras de pacientes en paraformaldehído, seguido de metanol, bloquearse con disolución de bloqueo, tal como suero de caballo, incubarse con el anticuerpo primario contra el polipéptido de fusión de CD74-ROS, seguido de un anticuerpo secundario marcado con un tinte fluorescente, tal como Alexa 488, y analizarse con un microscopio epifluorescente.
- 5
- 10 Los anticuerpos empleados en los ensayos descritos anteriormente pueden conjugarse, de forma ventajosa, con tintes fluorescentes (por ejemplo, Alexa488, PE), u otros marcadores, tales como puntos cuánticos, para su uso en análisis multiparamétricos, junto con otros anticuerpos de transducción de señales (EGFR, fosfo-AKT, fosfo-Erk 1/2) y/o de marcadores celulares (citoqueratina).
- 15 En la técnica se conoce una diversidad de otros protocolos, que incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), para medir los polipéptidos de ROS quinasa mutantes, y proporcionan una base para diagnosticar los niveles alterados o anómalos de la expresión del polipéptido de fusión de CD74-ROS. Los valores normales o patrón para la expresión del polipéptido de fusión de CD74-ROS se establecen combinando fluidos corporales o extractos celulares obtenidos de sujetos mamíferos normales, preferiblemente seres humanos, con un anticuerpo contra el polipéptido de fusión de CD74-ROS bajo condiciones adecuadas para la formación de complejos. La cantidad de formación de complejo de patrón puede cuantificarse mediante diversos métodos, pero preferiblemente por medios fotométricos. Las cantidades del polipéptido de fusión de CD74-ROS expresado en muestras del sujeto, control y de enfermedad procedentes de tejido de biopsia se comparan con los valores de los patrones. La desviación entre los valores de los patrones y del sujeto establece los parámetros para diagnosticar la enfermedad.
- 20
- 25 Ensayos de péptidos y nucleótidos
- De modo similar, pueden prepararse péptidos AQUA para la detección/cuantificación del polipéptido de ROS mutante expresado en una muestra biológica que comprende células procedentes de un tumor y emplearse en ensayos AQUA convencionales, tal como se describió en detalle en la anterior sección E. Por consiguiente, en algunas realizaciones preferidas de los métodos de la invención, el reactivo específico del polipéptido de fusión de CD74-ROS comprende un fosfopéptido marcado con un isótopo pesado (péptido AQUA) que se corresponde con una secuencia del péptido que comprende la zona de unión de fusión del polipéptido de fusión de CD74-ROS, según se describió en la anterior sección E.
- 30
- 35 Los reactivos específicos del polipéptido de ROS quinasa mutante útiles para la práctica de los métodos de la invención también pueden ser sondas de ARNm, de oligonucleótidos o de ADN que se hibridan directamente y detectan las transcripciones de expresión del polipéptido de fusión o truncado en una muestra biológica. Estas sondas se analizaron en detalle en la anterior sección B. Brevemente y como ejemplo, muestras de pacientes introducidas en parafina y fijadas en formaldehído puede sondarse con una sonda de ARN marcada con fluoresceína, seguido de lavados con formamida, SSC y PBS, y de un análisis con un microscopio fluorescente.
- 40 También pueden emplearse polinucleótidos que codifican un polipéptido de ROS quinasa mutante para objetivos de diagnóstico. Los polinucleótidos que pueden emplearse incluyen secuencias oligonucleotídicas, moléculas de ADN y ARN antisentido, y PNA. Los polinucleótidos pueden emplearse para detectar y cuantificar la expresión génica en tejidos de biopsia, en los que la expresión de un polipéptido de fusión de CD74-ROS o un polipéptido de ROS truncado puede correlacionarse con una enfermedad. El ensayo de diagnóstico puede emplearse para distinguir entre la ausencia, la presencia y el exceso de expresión del polipéptido de fusión de CD74-ROS, y para controlar la regulación de los niveles del polipéptido de fusión de CD74-ROS durante una intervención terapéutica.
- 45
- 50 En una realización preferida, la hibridación con sondas de PCR que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos, que incluyen secuencias genómicas, que codifican el polipéptido de fusión de CD74-ROS o el polipéptido de ROS quinasa truncado, o moléculas muy relacionadas, puede emplearse para identificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de ROS mutante. La construcción y el uso de dichas sondas se describió en la anterior sección B. La especificidad de la sonda, tanto si se prepara a partir de una región muy específica, por ejemplo, 10 nucleótidos exclusivos en la zona de unión de la fusión, o una región menos específica, por ejemplo, la región codificadora 3', y la rigurosidad de la hibridación o la amplificación (máxima, alta, intermedia o baja) determinará si la sonda identifica solo secuencias naturales que codifican el polipéptido de ROS quinasa mutante, alelos, o secuencias relacionadas.
- 55 Las sondas también pueden emplearse para la detección de secuencias relacionadas, y preferiblemente deben contener al menos 50% de los nucleótidos de cualquiera de las secuencias que codifican el polipéptido de ROS mutante. Las sondas de hibridación de la presente invención pueden ser ADN o ARN y derivarse de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO:2, y lo más preferiblemente incluyen la zona de unión de la fusión, o derivarse de la

secuencia genómica que incluye promotores, elementos de potenciadores, e intrones de los polipéptidos de CD74 y ROS naturales, tal como se describió más a fondo en la anterior sección B.

Puede utilizarse un polinucleótido de fusión de CD74-ROS o un polinucleótido de ROS truncado de la invención en un análisis de la transferencia Southern o Northern, una transferencia de puntos, u otras tecnologías basadas en membranas; en tecnologías de PCR; o en ensayos de inmersión de bastones, varillas, ELISA o chips que utilicen fluidos o tejidos procedentes de biopsias de pacientes para detectar una expresión alterada del polipéptido de ROS quinasa mutante. Estos métodos cualitativos o cuantitativos son muy conocidos en la técnica. En un aspecto concreto, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido de ROS mutante pueden ser útiles en ensayos que detectan la activación o la inducción de diversos cánceres, que incluyen cánceres de pulmón, que incluyen NSCLC. Los polinucleótidos de ROS mutante pueden marcarse por métodos convencionales y añadirse a una muestra de fluido o tejido procedente de un paciente bajo condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un periodo de incubación adecuado, la muestra se lava y la señal se cuantifica y se compara con un valor patrón. Si la cantidad de la señal en la muestra de biopsia o extraída se encuentra alterada significativamente con respecto a la de una muestra control comparable, las secuencias de nucleótidos se han hibridado con las secuencias de nucleótidos en la muestra, y la presencia de niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido de fusión de CD74-ROS o el polipéptido de ROS quinasa truncado en la muestra indica la presencia de la enfermedad asociada. Estos ensayos también pueden utilizarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico concreto en estudios animales, en ensayos clínicos, o para el control del tratamiento de un paciente individual.

Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad caracterizada por la expresión de un polipéptido de ROS mutante, se establece un perfil normal o patrón para la expresión. Esto puede lograrse combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con una secuencia, o uno de sus fragmentos, que codifica el polipéptido de fusión de CD74-ROS o el polipéptido de ROS quinasa truncado, bajo condiciones adecuadas para la hibridación o la amplificación. La hibridación patrón puede cuantificarse comparando los valores obtenidos de sujetos normales con los de un experimento en el que se emplea una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Los valores patrón obtenidos de las muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de pacientes que son sintomáticos para la enfermedad. Se emplea la desviación entre los valores patrón y del sujeto para establecer la presencia de enfermedad.

Tras haber establecido la enfermedad e iniciar un protocolo de tratamiento, los ensayos de hibridación pueden repetirse de modo regular para evaluar si el nivel de expresión en el paciente empieza a aproximarse al observado en el paciente normal. Los resultados obtenidos de ensayos sucesivos pueden emplearse para demostrar la eficacia del tratamiento a lo largo de un periodo de varios días a meses.

Otros usos de diagnóstico para los polinucleótidos de ROS mutante de la invención pueden implicar el uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), otro formato de ensayo preferido que emplean habitualmente los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª edición, Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Los oligómeros de la PCR pueden sintetizarse de modo químico, generarse de modo enzimático, o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros consistirán preferiblemente en dos secuencias de nucleótidos, una con la orientación sentido (5' a 3') y otra con la orientación antisentido (3' a 5'), y se emplean bajo condiciones optimizadas para la identificación de un trastorno o gen específico. Los mismos dos oligómeros, conjuntos anidados de oligómeros, o incluso una agrupación degenerada de oligómeros pueden emplearse bajo condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de ADN o ARN muy relacionadas.

Los métodos que también pueden utilizarse para cuantificar la expresión del polipéptido de fusión de CD74-ROS o del polipéptido de ROS quinasa truncado incluyen el marcaje radiactivo o los nucleótidos biotinilados, la coamplificación de un ácido nucleico control, y curvas patrón en las que se interpolan los resultados experimentales (Melby *et al.*, J. Immunol. Methods, 159:235-244 (1993); Duplaa *et al.*, Anal. Biochem., 229-236 (1993)). La velocidad de cuantificación de múltiples muestras puede acelerarse realizando el ensayo en un formato ELISA, en el que el oligómero de interés se presenta en diversas diluciones, y una respuesta espectrofotométrica o colorimétrica proporciona una cuantificación rápida.

En otra realización de la invención, los polinucleótidos de ROS mutantes de la invención pueden utilizarse para generar sondas de hibridación que son útiles para cartografiar la secuencia genómica natural. Las secuencias pueden cartografiarse en un cromosoma concreto o en una región específica del cromosoma empleando técnicas muy conocidas. Estas técnicas incluyen hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), FACS, o construcciones de cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, construcciones P1 bacterianas o bancos de ADNc de cromosomas individuales, tal como se describe en Price, C. M., Blood Rev., 7:127-134 (1993); y Trask, B. J., Trends Genet., 7:149-154 (1991).

En una realización preferida se emplea FISH (según se describe en Verma *et al.*, HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, Nueva York, N.Y. (1988)), y puede correlacionarse con otras técnicas de cartografiado de cromosomas físicas y datos de mapas genéticos. Pueden encontrarse ejemplos de datos de mapas genéticos en the 1994 Genome Issue of Science (265:1981f). La correlación entre la localización del

gen que codifica el polipéptido de fusión de CD74-ROS o el polipéptido de ROS truncado sobre un mapa cromosómico físico y una enfermedad específica, o la predisposición a una enfermedad específica, puede ayudar a delimitar la región de ADN asociada con esa enfermedad genética. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para detectar diferencias en las secuencias génicas entre individuos normales, portadores o afectados.

La hibridación *in situ* de preparaciones cromosómicas y las técnicas de cartografiado físico, tales como el análisis de conexiones empleando marcadores cromosómicos establecidos, pueden emplearse para extender los mapas genéticos. A menudo, la colocación de un gen sobre el cromosoma de otra especie de mamífero, tal como un ratón, puede revelar marcadores asociados, incluso si se desconoce el número o el brazo de un cromosoma humano concreto. Pueden asignarse nuevas secuencias a brazos cromosómicos, o a sus partes, mediante cartografiado físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que están buscando genes de enfermedades empleado clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Tras haber localizado toscamente la enfermedad o el síndrome mediante conexión genética con una región genómica concreta, por ejemplo, AT a 11q22-23 (Gatti *et al.*, Nature, 336:577-580 (1988)), cualquier cartografiado de secuencias del área puede representar genes asociados o reguladores para una posterior investigación. La secuencia de nucleótidos de la presente invención también puede utilizarse para detectar diferencias en la localización cromosómica debidas a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

Muestras biológicas

Las muestras biológicas útiles en la práctica de los métodos de la invención pueden obtenerse de cualquier mamífero en el que un cáncer se caracterice por la presencia de un polipéptido de fusión de CD74-ROS o pueda estar presente o en desarrollo. En una realización, el mamífero es un ser humano, y el ser humano puede ser un candidato para recibir un producto terapéutico inhibidor de ROS, para el tratamiento de un cáncer de pulmón, por ejemplo, NSCLC. El candidato humano puede ser un paciente que en ese momento se esté tratando, o que se esté considerando tratar, con un inhibidor de ROS quinasa. En otra realización, el mamífero es un animal grande, tal como un caballo o una vaca, mientras que en otras realizaciones, el mamífero es un animal pequeño, tal como un perro o un gato, de los cuales se sabe que todos desarrollan cánceres, incluyendo cánceres de pulmón.

Cualquier muestra biológica que comprenda células (o extractos de células) procedentes de un cáncer de mamífero es adecuada para su uso en los métodos de la invención. En una realización, la muestra biológica comprende células obtenidas de una biopsia tumoral. La biopsia puede obtenerse, según técnicas clínicas convencionales, de tumores primarios que aparecen en un órgano de un mamífero, o de tumores secundarios que han metastatizado a otros tejidos. En otra realización, la muestra biológica comprende células obtenidas con un aspirado con aguja fina extraídas de un tumor, y las técnicas para obtener estos aspirados son muy conocidas en la técnica (véase, Cristallini *et al.*, Acta Cytol., 36(3):416-422 (1992)).

La muestra biológica también puede comprender células obtenidas de una efusión, tal como una efusión pleural. Se sabe que se forman efusiones pleurales (el líquido que se forma fuera del pulmón en la cavidad torácica y que contiene células cancerosas) en muchos pacientes con cáncer de pulmón avanzado (que incluye NSCLC), y la presencia de dicha efusión es predictiva de un resultado malo y un tiempo de supervivencia corto. Las técnicas convencionales para obtener muestras de efusiones pleurales se han descrito y son muy conocidas en la técnica (véase, Sahn, Clin. Chest. Med., 3(2):443-452 (1982)). También pueden obtenerse células tumorales en circulación del suero empleando marcadores tumorales, marcadores de proteínas de citoqueratina u otros métodos de selección negativa, tal como se ha descrito (véase, Ma *et al.*, Anticancer Res., 23(1A):49-62 (2003)). Las muestras de suero y de médula ósea pueden ser particularmente preferidas para pacientes con leucemia. Se ha observado la expresión aberrante de ROS en un glioblastoma. Véase, Charest *et al.*, *supra*.

Una muestra biológica puede comprender células (o extractos celulares) procedentes de un cáncer en el que el polipéptido de fusión de CD74-ROS o el polipéptido de ROS quinasa truncado se expresa y/o activa, pero no la ROS quinasa de tipo salvaje. Como alternativa, la muestra puede comprender células de un cáncer en el que el polipéptido de ROS mutante y la ROS quinasa de tipo salvaje se expresan y/o activan, o en el que la ROS quinasa y/o CD74 de tipo salvaje se expresan y/o activa, pero no el polipéptido de ROS mutante.

Pueden prepararse extractos celulares de las anteriores muestras biológicas, en bruto o parcial o totalmente purificados, según técnicas convencionales, y emplearse en los métodos de la invención. Como alternativa, las muestras biológicas que comprenden células completas pueden utilizarse en formatos de ensayo preferidos, tales como una inmunohistoquímica (IHC), una citometría de flujo (FC), y una inmunofluorescencia (IF), tal como se describió anteriormente. Estos ensayos de células completas son ventajosos, puesto que minimizan la manipulación de la muestra de células tumorales y, así, reducen los riesgos de alterar el estado de señalización/activación *in vivo* de las células y/o la introducción de señales accidentales. Los ensayos de células completas también son ventajosos porque caracterizan la expresión y la señalización solo en células tumorales, en lugar de una mezcla de células tumorales y normales.

En la práctica del método descrito para determinar si un compuesto inhibe el avance de un tumor caracterizado por la translocación y/o el polipéptido de fusión de CD74-ROS, también pueden emplearse de modo ventajoso muestras

biológicas que comprendan células procedentes de xenoinjertos de mamífero (o trasplantes de médula ósea). Los xenoinjertos preferidos (o receptores de trasplantes) son mamíferos pequeños, tales como ratones, que porten tumores humanos (o leucemias) que expresen un polipéptido de ROS quinasa mutante. Los xenoinjertos que portan tumores humanos son muy conocidos en la técnica (véase, Kal, *Cancer Treat Res.*, 72:155-169 (1995)), y la producción de xenoinjertos de mamífero que portan tumores humanos ha sido bien descrita (véase, Winograd *et al.*, *In Vivo*, 1 (1): 1-13 (1987)). De modo similar, la generación y el uso de modelos de trasplantes de médula ósea ha sido bien descrito (véase, por ejemplo, Schwaller, *et al.*, *EMBO J.*, 17:5321-5333 (1998); Kelly *et al.*, *Blood*, 99:310-318 (2002)). Un cáncer "caracterizado por" una translocación y/o un polipéptido de fusión de CD74-ROS significa un cáncer en el que dicho gen de ROS mutante y/o polipéptido expresado está presente, comparado con un cáncer en el que dicha translocación y/o polipéptido de fusión no están presentes.

Para evaluar la presencia de un polinucleótido de ROS mutante o la expresión del polipéptido en una muestra biológica que comprende células procedentes de un tumor canceroso de mamífero, puede emplearse de forma deseada una muestra control que representa una célula en la que dicha translocación y/o proteína de fusión no están presentes, con objetivos comparativos. De modo ideal, la muestra control comprende células de un subconjunto del cáncer concreto (por ejemplo, NSCLC) que es representativo del subconjunto en el que la mutación (por ejemplo, la translocación de CD74-ROS) no aparece y/o el polipéptido de fusión no se expresa. Comparando el nivel en la muestra control frente a la muestra biológica de ensayo se puede saber si el polipéptido y/o polinucleótido mutante está o están presentes. Como alternativa, puesto que el polipéptido y/o polinucleótido de fusión de CD74-ROS pueden no estar presentes en la mayoría de los cánceres, cualquier tejido que, de modo similar, no exprese el polipéptido de ROS mutante (o porte el polinucleótido mutante) puede emplearse como control.

Los métodos descritos a continuación tienen una utilidad de diagnóstico valiosa para los cánceres caracterizados por un polipéptido y/o un polinucleótido de ROS mutante y para las decisiones de tratamiento implicadas. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras biológicas de un sujeto que previamente no haya sido diagnosticado con un cáncer caracterizado por una translocación y/o un polipéptido de fusión de CD74-ROS, o que aún no haya sido sometido a tratamiento para dicho cáncer, y el método se emplea para identificar, a través de un diagnóstico, si dicho sujeto pertenece a un subconjunto de tumores (por ejemplo, tumores NSCLC) en los que un polinucleótido y/o un polipéptido de ROS mutante está presente/se expresa.

Como alternativa, una muestra biológica puede obtenerse de un sujeto al que se le ha diagnosticado un cáncer dirigido por un tipo de quinasa, tal como EGFR, y que ha estado recibiendo terapia, tal como una terapia con un inhibidor de EGFR (por ejemplo, Tarceva™, Iressa™) para el tratamiento de dicho cáncer, y el método de la invención se emplea para identificar si el tumor del sujeto también se caracteriza por una translocación y/o polipéptido de fusión de CD74-ROS y, por tanto, es probable que responda totalmente a la terapia existente y/o si resulta deseable o está justificada una terapia alternativa o adicional con un inhibidor de ROS quinasa. Los métodos de la invención también pueden emplearse para controlar el avance o la inhibición de un cáncer que expresa un polipéptido de ROS mutante después del tratamiento de un sujeto con una composición que comprende un producto terapéutico o una combinación de productos terapéuticos inhibidores de ROS quinasa.

Este ensayo de diagnóstico puede realizarse después o antes de una evaluación preliminar o de procedimientos de vigilancia quirúrgica. El método de identificación de la invención puede emplearse de modo ventajoso como diagnóstico para identificar pacientes que tienen cáncer, tal como NSCLC, dirigido por una proteína de fusión de CD74-ROS, y sería muy probable que estos pacientes respondan a productos terapéuticos dirigidos a la inhibición de la actividad ROS quinasa. La capacidad para seleccionar dichos pacientes también sería útil en la evaluación clínica de la eficacia de futuros productos terapéuticos dirigidos a ROS, así como en la prescripción futura de dichos fármacos a pacientes.

Diagnósticos

La capacidad para identificar selectivamente cánceres en los que la translocación y/o polipéptido de fusión de CD74-ROS está presente permite desarrollar nuevos métodos para identificar con precisión dichos tumores para objetivos de diagnóstico, así como obtener información útil para determinar si es probable que un tumor responda a una composición terapéutica inhibidora de ROS, o si es probable que no responda parcial o totalmente a un inhibidor que se dirija a una quinasa diferente cuando se administra como agente individual para el tratamiento del cáncer.

Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un método para detectar la presencia de un polinucleótido y/o polipéptido de ROS mutante en un cáncer, y dicho método comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica de un paciente que tiene cáncer; y (b) utilizar al menos un reactivo que detecte un polinucleótido o polipéptido de ROS mutante de la invención para determinar si un polinucleótido y/o un polipéptido de fusión de CD74-ROS está presente en la muestra biológica.

En algunas realizaciones preferidas, el cáncer es un cáncer de pulmón, tal como un carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC). En otras realizaciones preferidas, la presencia de un polipéptido de ROS quinasa mutante identifica un cáncer que es probable que responda a una composición que comprenda al menos un producto terapéutico inhibidor de ROS quinasa.

En algunas realizaciones preferidas, los métodos de diagnóstico la invención se aplican en un formato de ensayo de citometría de flujo (FC), inmunohistoquímica (IHC), o inmunofluorescencia (IF). En otra realización preferida se detecta la actividad del polipéptido de fusión de CD74-ROS. En otras realizaciones preferidas, los métodos de diagnóstico de la invención se aplican en un formato de ensayo de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) o de reacción en cadena de polimerasa (PCR).

La invención proporciona también un método para determinar si un compuesto inhibe el avance de un cáncer caracterizado por un polinucleótido o polipéptido de fusión de CD74-ROS, y dicho método comprende la etapa de determinar si dicho compuesto inhibe la expresión y/o la actividad de dicha fusión de CD74-ROS en dicho cáncer. En una realización preferida, se determina la inhibición de la expresión y/o actividad del polipéptido de fusión de CD74-ROS empleando al menos un reactivo que detecte un polinucleótido o polipéptido de fusión de CD74-ROS de la invención. Los compuestos adecuados para la inhibición de la actividad ROS quinasa se analizan más en detalle en la siguiente sección G.

Las sondas de polinucleótidos de ROS mutante y los reactivos específicos de polipéptido útiles en la práctica de los métodos de la invención se describieron con más detalle en las anteriores secciones B y D. En una realización preferida, el reactivo específico del polipéptido de fusión de CD74-ROS comprende un anticuerpo específico del polipéptido de fusión. En otra realización preferida, el reactivo específico del polipéptido de fusión comprende un fosfopéptido marcado con isótopos pesados (péptido AQUA) que se corresponde con la zona de unión de la fusión de un polipéptido de fusión de CD74-ROS.

Los métodos de la invención descritos anteriormente también pueden comprender opcionalmente la etapa de determinar el nivel de expresión o activación de otras quinasas, tales como ROS y EGFR de tipo salvaje, u otras moléculas de señalización corriente abajo en dicha muestra biológica. La determinación de los perfiles de la expresión/activación del polipéptido de fusión de CD74-ROS y de la expresión/activación de otras quinasas y vías en una muestra biológica dada puede proporcionar información valiosa sobre cuáles son las quinasas y las vías que están dirigiendo la enfermedad y, por tanto, cuál es el régimen terapéutico que sea el que probablemente ofrezca el mayor beneficio.

Selección de compuestos

El descubrimiento de los nuevos polipéptidos de fusión de CD74-ROS descritos en la presente también permite el desarrollo de nuevos compuestos que inhiben la actividad de estas proteínas de ROS mutantes, en particular su actividad ROS quinasa. Por consiguiente, la invención proporciona también, en parte, un método para determinar si un compuesto inhibe el avance de un cáncer caracterizado por un polinucleótido y/o un polipéptido de fusión de CD74-ROS, y dicho método comprende la etapa de determinar si dicho compuesto inhibe la expresión y/o la actividad de dicho polipéptido de fusión de CD74-ROS en dicho cáncer. En una realización preferida, se determina la inhibición de la expresión y/o actividad del polipéptido de fusión de CD74-ROS empleando al menos un reactivo que detecte un polinucleótido de ROS mutante y/o polipéptido de ROS mutante de la invención. Los reactivos preferidos de la invención se han descrito anteriormente. Los compuestos adecuados para la inhibición de la actividad ROS quinasa se describen con más detalle en la siguiente sección G.

El compuesto puede ser, por ejemplo, un inhibidor de quinasas, tal como un inhibidor de molécula pequeña o de anticuerpo. Puede ser un inhibidor de panquinasas con actividad contra varias quinasas diferentes, o un inhibidor específico de quinasa. Los compuestos inhibidores de ROS quinasa se analizan con más detalle en la siguiente sección G. Las muestras biológicas de los pacientes pueden tomarse antes y después del tratamiento con el inhibidor y después analizarse, empleando los métodos descritos anteriormente, para el efecto biológico del inhibidor sobre la actividad ROS quinasa, que incluye la fosforilación de la proteína sustrato corriente abajo. Este ensayo farmacodinámico puede ser útil para determinar la dosis biológicamente activa del fármaco que puede ser preferible a una dosis máxima tolerable. Esta información también sería útil en propuestas para la aprobación de fármacos demostrando el mecanismo de acción del fármaco. La identificación de compuestos con estas características inhibidoras deseadas se describe más a fondo en la siguiente sección G.

G. Inhibición terapéutica de cánceres

Según la presente invención, ahora se ha demostrado que el polipéptido de fusión de CD74-ROS aparece en al menos un subgrupo de NSCLC humano. Por consiguiente, el avance de un cáncer de mamífero (por ejemplo, NSCLC), en el que la proteína de fusión de CD74-ROS se expresa, puede inhibirse *in vivo* inhibiendo la actividad de ROS quinasa en dicho cáncer. La actividad ROS en cánceres caracterizados por la expresión de una ROS quinasa mutante puede inhibirse poniendo en contacto el cáncer (por ejemplo, un tumor) con un producto terapéutico inhibidor de ROS quinasa. Por consiguiente, en la presente se describe un método para inhibir el avance de un cáncer que expresa un polipéptido de fusión de CD74-ROS mediante la inhibición de la expresión y/o la actividad de la ROS quinasa en el cáncer.

Un producto terapéutico inhibidor de ROS quinasa puede ser cualquier composición que comprenda al menos un compuesto, biológico o químico, que inhibe, directa o indirectamente, la expresión y/o la actividad de ROS quinasa *in vivo*, que incluye los ejemplos de clases de compuestos descritos a continuación. Estos compuestos incluyen

5 productos terapéuticos que actúan directamente sobre la propia ROS quinasa, o sobre proteínas o moléculas que modifican la actividad de ROS, o que actúan indirectamente inhibiendo la expresión de ROS. Estas composiciones también incluyen composiciones que comprenden solo un único compuesto inhibidor de ROS quinasa, así como composiciones que comprenden múltiples productos terapéuticos (que incluyen productos contra otras RTK), que también pueden incluir un agente terapéutico no específico, tal como un agente quimioterapéutico o un inhibidor de la transcripción general.

Inhibidores de molécula pequeña

10 En algunas realizaciones preferidas, un producto terapéutico inhibidor de ROS útil en la práctica de los métodos de la invención es un inhibidor de molécula pequeña dirigido. Los inhibidores dirigidos de molécula pequeña son una clase de moléculas que generalmente inhiben la actividad de su enzima diana uniéndose de forma específica, y a menudo irreversible, con el sitio catalítico de la enzima y/o uniéndose a una hendidura de unión a ATP u otro sitio de unión dentro de la enzima que evite que la enzima adopte una conformación necesaria para su actividad. Un ejemplo de inhibidor de quinasa dirigido de molécula pequeña es Gleevec® (Imatinib, STI-571), que inhibe CSF1R y BCR-ABL, y sus propiedades han sido bien descritas. Véase, Dewar *et al.*, Blood, 105(8):3127-3132 (2005).

15 Los inhibidores de molécula pequeña pueden diseñarse de modo lógico empleando la formación de modelos informáticos o cristalográficos de rayos X de la estructura tridimensional de ROS quinasa, o pueden encontrarse a través de una selección de alta capacidad de procesamiento de bancos de compuestos para la inhibición de ROS. Estos métodos son muy conocidos en la técnica y han sido descritos. La especificidad de la inhibición de ROS puede confirmarse, por ejemplo, estudiando la capacidad de dicho compuesto para inhibir la actividad ROS, pero no
20 otra actividad quinasa, en un panel de quinasas, y/o estudiando la inhibición de la actividad ROS en una muestra biológica que comprende células de tumor NSCLC, tal como se describió anteriormente. Estos métodos de selección se describen con más detalle a continuación.

Inhibidores de anticuerpos

25 Los productos terapéuticos inhibidores de ROS quinasa útiles en los métodos de la invención también pueden ser anticuerpos dirigidos que se unen específicamente a dominios o sitios catalíticos o de unión críticos necesarios para la actividad ROS, e inhiben la quinasa bloqueando el acceso de ligandos, sustratos o moléculas secundarias y/o evitando que la enzima adopte una conformación necesaria para su actividad. La producción, selección y uso terapéutico de anticuerpos específicos de dianas humanizadas ha sido bien descrito. Véase, Merluzzi *et al.*, Adv. Clin. Path., 4 (2):77-85 (2000). Están disponibles sistemas y tecnologías comerciales, tales como Morphosys, Inc.'s
30 Human Combinatorial Antibody Library (HuCAL®), para la generación y selección de alta capacidad de procesamiento de anticuerpos inhibidores específicos de diana humanizados.

La producción de diversos anticuerpos dirigidos anti-receptores de quinasas y su uso para inhibir la actividad del receptor diana se ha descrito. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EEUU n.º 20040202655, "Antibodies to IGF-I Receptor for the Treatment of Cancers," 14 de octubre, 2004, Morton *et al.*; la publicación de patente de EEUU n.º 20040086503, "Human anti-Epidermal Growth Factor Receptor Single-Chain Antibodies," 15 de abril, 2004, Raisch *et al.*; la publicación de patente de EEUU n.º 20040033543, "Treatment of Renal Carcinoma Using Antibodies Against the EGFr," 19 de febrero, 2004, Schwab *et al.* En la técnica se conocen métodos estandarizados para producir y utilizar anticuerpos inhibidores de la actividad del receptor de tirosina quinasas. Véase, por ejemplo, la patente europea n.º EP1423428, "Antibodies that Block Receptor Tyrosine Kinase Activation, Methods of
40 Screening for and Uses Thereof," 2 de junio, 2004, Borges *et al.*

También pueden emplearse estrategias de presentación de fagos para generar inhibidores de anticuerpos específicos de ROS, y se describen protocolos para la construcción de bancos de bacteriófagos y la selección de anticuerpos recombinantes en el texto de referencia bien conocido CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Colligan *et al.* (eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), capítulo 17, sección 17.1. Véase también la patente de EEUU n.º 6.319.690, 20 de noviembre, 2001, Little *et al.*; la patente de EEUU n.º 6.300.064, 9 de octubre, 2001, Knappik *et al.*; la patente de EEUU n.º 5.840.479, 24 de noviembre, 1998, Little *et al.*; la publicación de patente de EEUU n.º 20030219839, 27 de noviembre, 2003, Bowdish *et al.*

50 Puede producirse un banco de fragmentos de anticuerpos mostrados sobre la superficie de bacteriófagos (véase, por ejemplo, la patente de EEUU 6.300.064, 9 de octubre, 2001, Knappik *et al.*) y seleccionarse para la unión a una forma dimérica soluble de un receptor de proteína tirosina quinasa (como ROS). Un fragmento de anticuerpo que se une a la forma dimérica soluble de la RTK empleado para la selección se identifica como una molécula candidata para bloquear la activación constitutiva de la RTK diana en una célula. Véase la patente europea n.º EP1423428, Borges *et al.*, *supra*.

55 Los anticuerpos dirigidos a la unión a ROS identificados en la selección de bancos de anticuerpos, tal como se describió anteriormente, después pueden seleccionarse para su capacidad para bloquear la actividad de ROS, en un ensayo de quinasas *in vitro* y en líneas celulares y/o tumores *in vivo*. La inhibición de ROS puede confirmarse, por ejemplo, estudiando la capacidad de dicho anticuerpo terapéutico para inhibir la actividad ROS quinasa, pero no otra actividad quinasa, en un panel de quinasas, y/o estudiando la inhibición de la actividad ROS en una muestra

biológica que comprende células de cáncer, tal como se describió anteriormente. Los métodos para seleccionar dichos compuestos para la inhibición de ROS quinasa se describieron con más detalle anteriormente.

Inhibidores indirectos

5 Los compuestos inhibidores de ROS útiles en la práctica de los métodos descritos también pueden ser compuestos que inhiben indirectamente la actividad ROS inhibiendo la actividad de proteínas o moléculas distintas de la propia ROS quinasa. Estos productos terapéuticos inhibidores pueden ser inhibidores dirigidos que modulan la actividad de quinastas reguladoras clave que fosforilan o desfosforilan (y, por tanto, activan o desactivan) a la propia ROS, o que interfieren con la unión de los ligandos. Al igual que con otros receptores de tirosina quinastas, ROS regula la señalización corriente abajo a través de una red de proteínas adaptadoras y quinastas corriente abajo. Como resultado, la inducción del crecimiento celular y la supervivencia por la actividad de ROS puede inhibirse dirigiendo estas proteínas interactivas o de corriente abajo.

15 La actividad ROS quinasa también puede ser inhibida indirectamente empleando un compuesto que inhiba la unión de una molécula activadora necesaria para que ROS adopte su conformación activa. Por ejemplo, se ha descrito la producción y el uso de anticuerpos anti-PDGF. Véase la publicación de patente de EEUU n.º 20030219839, "Anti-PDGF Antibodies and Methods for Producing Engineered Antibodies," Bowdish *et al.* La inhibición de la unión del ligando (PDGF) al receptor directamente infrarregula la actividad del receptor.

20 Los inhibidores indirectos de la actividad ROS pueden diseñarse de modo lógico empleando la formación de modelos informáticos o cristalográficos de rayos X de la estructura tridimensional de ROS quinasa, o pueden encontrarse a través de una selección de alta capacidad de procesamiento de bancos de compuestos para la inhibición de enzimas reguladoras clave corriente arriba y/o moléculas de unión necesarias, que resulta en la inhibición de la actividad ROS quinasa. Estas estrategias son muy conocidas en la técnica y han sido descritas. La inhibición de ROS por dichos productos terapéuticos puede confirmarse, por ejemplo, estudiando la capacidad del compuesto para inhibir la actividad ROS, pero no otra actividad quinasa, en un panel de quinastas, y/o estudiando la inhibición de la actividad ROS en una muestra biológica que comprende células de cáncer, por ejemplo, células de NSCLC, tal como se describió anteriormente. Los métodos para identificar compuestos que inhiben un cáncer caracterizado por una translocación y/o polipéptido de fusión de CD74-ROS y/o un polinucleótido y/o polipéptido de ROS truncado se describen con más detalle a continuación.

Inhibidores antisentido y/o de la transcripción

30 Los productos terapéuticos inhibidores de ROS también comprenden compuestos antisentido y/o inhibidores de la transcripción que inhiben la actividad ROS quinasa bloqueando la transcripción del gen que codifica ROS y/o el gen de fusión de CD74-ROS. Se ha descrito la inhibición de diversos receptores de quinastas, que incluyen VEGFR, EGFR, e IGFR, y FGFR, por productos terapéuticos antisentido para el tratamiento del cáncer. Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU n.ºs 6.734.017; 6.710.174, 6.617.162, 6.340.674; 5.783.683; 5.610.288.

35 Pueden diseñarse y construirse oligonucleótidos antisentido y emplearse como agentes terapéuticos contra genes diana según técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Cohen, J., Trends in Pharmacol. Sci., 10(11):435-437 (1989); Marcus-Sekura, Anal. Biochem., 172:289-295 (1988); Weintraub, H., Sci. AM., pp. 40-46 (1990); Van Der Krol *et al.*, BioTechniques, 6(10):958-976 (1988); Skorski *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), 91:4504-4508. La inhibición del crecimiento de carcinomas humanos *in vivo* empleando un inhibidor de ARN antisentido de EGFR se ha descrito en fechas recientes. Véase la publicación de patente de EEUU n.º 20040047847, "Inhibition of Human Squamous Cell Carcinoma Growth In vivo by Epidermal Growth Factor Receptor Antisense RNA Transcribed from a Pol III Promoter," 11 de marzo, 2004, He *et al.* De forma similar, un producto terapéutico inhibidor de ROS que comprende al menos un oligonucleótido antisentido contra un gen ROS de mamífero (véase la figura 4 (SEQ ID NO:8) o un polinucleótido de fusión de CD74-ROS o un polinucleótido de ROS truncado (véase la figura 2 (SEQ ID NO:2) puede prepararse según los métodos descritos anteriormente. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas que comprendan compuestos antisentido inhibidores de ROS y administrarse como se describe más a fondo a continuación.

ARN interferente pequeño

50 Las composiciones de moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip), que inhiben la traducción y, por tanto, la actividad, de ROS a través del proceso de interferencia de ARN, también pueden emplearse de modo deseable en los métodos de la invención. La interferencia de ARN y la silenciación selectiva de la expresión de la proteína diana mediante la introducción de moléculas de ARN bicatenarias pequeñas exógenas que comprenden una secuencia complementaria con el ARNm que codifica la proteína diana ha sido bien descrita. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EEUU n.º 20040038921, "Composition and Method for Inhibiting Expression of a Target Gene," 26 de febrero, 2004, Kreutzer *et al.*; la publicación de patente de EEUU n.º 20020086356, "RNA Sequence-Specific Mediators of RNA Interference," 12 de junio, 2003, Tuschl *et al.*; la publicación de patente de EEUU 20040229266, "RNA Interference Mediating Small RNA Molecules," 18 de noviembre, 2004, Tuschl *et al.*

55 Por ejemplo, según se describe en el ejemplo 3, la silenciación mediada por ARNip de la expresión de la proteína de fusión de CD74-ROS puede realizarse en una línea celular de NSCLC humana que expresa la proteína de fusión.

- Las moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) han demostrado que pueden bloquear la expresión de genes mediante un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia de ARN (ARNi). Brevemente, la ARNasa III Dicer procesa el ARNbc para producir ARN interferente pequeño (ARNip) de aproximadamente 22 nucleótidos, que actúa como secuencia guía para inducir la ruptura de ARNm específica de diana por un complejo silenciador inducido por ARN RISC (véase Hammond *et al.*, Nature (2000), 404:293-296). El ARNi implica una reacción de tipo catalítico por la cual se generan ARNip a través de la ruptura sucesiva de ARNbc más largo. Así, a diferencia del antisentido, el ARNi degrada el ARN diana de una manera no estequiométrica. Cuando se administra a una célula o a un organismo, el ARNbc exógeno ha demostrado que dirige la degradación específica de secuencia del ARN mensajero endógeno (ARNm) a través de ARNi.
- Una amplia diversidad de productos de ARNip específicos de diana, que incluyen vectores y sistemas para su expresión y uso en células de mamífero, están disponibles en el mercado. Véase, por ejemplo, Promega, Inc. (www.promega.com); Dharmacon, Inc. (www.dharmacon.com). Están disponibles manuales técnicos detallados sobre el diseño, la construcción y el uso de ARNbc para ARNi. Véase, por ejemplo, "RNAi Technical Reference & Application Guide" de Dharmacon; "RNAi: A Guide to Gene Silencing," de Promega. También están disponibles en el mercado productos de ARNip inhibidores de ROS, y pueden emplearse de modo adecuado en el método de la invención. Véase, por ejemplo, Dharmacon, Inc., Lafayette, CO (n.ºs de catálogo M-003162-03, MU-003162-03, D-003162-07 hasta -10 (ARNip siGENOME™ SMARTselection y SMARTpool®).
- Recientemente se ha establecido que los ARNbc pequeños con una longitud menor que 49 nucleótidos, y preferiblemente 19-25 nucleótidos, que comprenden al menos una secuencia que es sustancialmente idéntica a parte de una secuencia de ARNm diana, y dicho ARNbc tiene óptimamente al menos una proyección de 1-4 nucleótidos en un extremo, son los más eficaces en la mediación del ARNi en mamíferos. Véase la publicación de patente de EEUU n.º 20040038921, Kreutzer *et al.*, *supra*; la publicación de patente de EEUU n.º 20040229266, Tuschl *et al.*, *supra*. La construcción de dichos ARNbc y su uso en preparaciones farmacéuticas para silenciar la expresión de una proteína diana *in vivo* se describe en detalle en dichas publicaciones.
- Si se conoce la secuencia del gen diana en un mamífero pueden producirse ARN de 21-23 nt, por ejemplo, y ensayarse para su capacidad para la mediación del ARNi en una célula de mamífero, tal como una célula humana o de otro primate. Estas moléculas de ARN de 21-23 nt que se ha demostrado que median en el ARNi pueden ensayarse, si se desea, en un modelo animal apropiado para evaluar también su eficacia *in vivo*. Los sitios diana que se conocen, por ejemplo, los sitios diana que se ha determinado que son sitios diana eficaces basándose en estudios con otras moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, ribozimas o antisentido, o las dianas que se sabe que están asociadas con una enfermedad o un trastorno, tales como los sitios que contienen mutaciones o deleciones, pueden emplearse para diseñar moléculas de ARNip que se dirijan también a esos sitios.
- Como alternativa, pueden predecirse/diseñarse de forma lógica las secuencias de los ARNbc eficaces mediante la selección del ARNm diana de interés para sitios diana, por ejemplo, empleando un algoritmo de plegamiento informático. La secuencia diana puede analizarse por ordenador para producir una lista de todos los fragmentos o subsecuencias de una longitud concreta, por ejemplo fragmentos de 23 nucleótidos, empleando programas de análisis de secuencias comerciales o secuencias de instrucciones Perl adaptadas, tales como Oligo, MacVector, o el paquete GCG Wisconsin.
- Pueden emplearse diversos parámetros para determinar los sitios diana más adecuados dentro de la secuencia de ARN diana. Estos parámetros incluyen, pero no se limitan a la estructura secundaria o terciaria del ARN, la composición de bases nucleotídicas de la secuencia diana, el grado de homología entre diversas regiones de la secuencia diana, o la posición relativa de la secuencia diana dentro de la transcripción del ARN. Basándose en estas determinaciones, puede elegirse cualquier número de sitios diana dentro de la transcripción del ARN para seleccionar moléculas de ARNip según su eficacia, por ejemplo, empleando ensayos de ruptura de ARN *in vitro*, cultivos celulares o modelos animales. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EEUU n.º 20030170891, 11 de septiembre, 2003, McSwiggen J. Recientemente también se ha descrito un algoritmo para identificar y seleccionar sitios diana de ARNi. Véase la publicación de patente de EEUU n.º 20040236517, "Selection of Target Sites for Antisense Attack of RNA," 25 de noviembre, 2004, Drlica *et al.*
- Las técnicas de transferencia de genes que se emplean habitualmente incluyen los métodos de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación y microinyección, y métodos víricos (Graham *et al.* (1973), Virol. 52:456; McCutchan *et al.* (1968), J. Natl. Cancer Inst., 41:351; Chu *et al.* (1987), Nucl. Acids Res., 15:1311; Fraley *et al.* (1980), J. Biol. Chem., 255:10431; Capecchi (1980), Cell, 22:479). El ADN también puede introducirse en las células empleando liposomas catiónicos (Feigner *et al.* (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413). Las formulaciones de lípidos catiónicos disponibles en el mercado incluyen Tfx 50 (Promega) o Lipofectamin 200 (Life Technologies).
- Como alternativa, pueden emplearse vectores víricos para transportar el ARNbc a una célula y mediar en el ARNi. Véase la publicación de patente de EEUU n.º 20040023390, "siRNA-mediated Gene Silencing with Viral Vectors," 4 de febrero, 2004, Davidson *et al.*
- La transfección y los sistemas de expresión/vector para ARNi en células de mamífero están disponibles en el mercado y han sido bien descritos. Véase, por ejemplo, Dharmacon, Inc., sistema DharmaFECT™; Promega, Inc., sistema de horquilla U6 siSTRIKE™; véase también, Gou *et al.* (2003), FEBS, 548, 113-118; Sui, G. *et al.*, A DNA

vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells (2002), Proc. Natl. Acad. Sci., 99, 5515-5520; Yu *et al.* (2002), Proc. Natl. Acad. Sci., 99, 6047-6052; Paul, C. *et al.* (2002), Nature Biotechnology, 19, 505-508; McManus *et al.* (2002), RNA, 8, 842-850.

5 La interferencia de ARNip en un mamífero en un mamífero empleando moléculas de ARNbc preparadas después puede realizarse administrando una preparación farmacéutica que comprende el ARNbc al mamífero. La composición farmacéutica se administra en una dosificación suficiente para inhibir la expresión del gen diana. El ARNbc generalmente puede administrarse a una dosificación menor que 5 mg de ARNbc por kilogramo de peso corporal diarios, y es suficiente para inhibir o completamente suprimir la expresión del gen diana. En general, una dosis adecuada de ARNbc estará en el intervalo de 0,01 a 2,5 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor diarios, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 200 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 100 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios, aún más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 50 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios, y lo más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 25 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios. Una composición farmacéutica que comprende el ARNbc se administra una vez diaria, o en múltiples subdosis, por ejemplo, 10 empleando formulaciones de liberación sostenida muy conocidas en la técnica. La preparación y administración de dichas formulaciones farmacéuticas puede realizarse según técnicas convencionales, tal como se describe más a fondo a continuación. 15

Estos ARNbc después pueden utilizarse para inhibir la expresión y actividad de ROS en un cáncer, preparando una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc, tal como se describió anteriormente, y administrando la preparación a un sujeto humano que tenga un cáncer que expresa la proteína de fusión de CD74-ROS o el polipéptido de ROS quinasa truncado, mediante la inyección directa al tumor. La inhibición similar de otros receptores de tirosina quinasa, tales como VEGFR y EGFR, empleando inhibidores de ARNip ha sido descrita recientemente. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EEUU n.º 20040209832, 21 de octubre, 2004, McSwiggen *et al.*; la publicación de patente de EEUU n.º 20030170891, 11 de septiembre, 2003, McSwiggen; la publicación de patente de EEUU n.º 20040175703, 9 de septiembre, 2004, Kreutzer *et al.* 20 25

Composiciones terapéuticas: administración

Las composiciones terapéuticas inhibitoras de ROS quinasa útiles en la práctica de los métodos de la invención pueden administrarse a un mamífero por cualquier medio conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a las vías oral o peritoneal, que incluyen la administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, a través de las vías respiratorias (aerosol), rectal, vaginal y tópica (que incluye bucal y sublingual). 30

Para la administración oral, un producto terapéutico inhibidor de ROS se proporciona en general en forma de comprimidos o cápsulas, como un polvo o gránulos, o como una suspensión o disolución acuosa. Los comprimidos para el uso oral pueden incluir los ingredientes activos mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes ligantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, 35 agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes ligantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, en general será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden revestirse con un material, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal. 40

Las cápsulas para el uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura, en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido, y cápsulas de gelatina blanda, en las que los ingredientes activos se mezclan con agua o un aceite, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Para un uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, las composiciones farmacéuticas de la invención en general se proporcionan en suspensiones o disoluciones acuosas estériles, tamponadas hasta un pH e isotonicidad apropiados. Los vehículos acuosos adecuados incluyen disolución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. El vehículo puede consistir exclusivamente de un tampón acuoso ("exclusivamente" significa que no están presentes agentes auxiliares o encapsulantes que pudieran afectar o mediar en la captación del producto terapéutico inhibidor de ROS). Estas sustancias incluyen, por ejemplo, estructuras micelares, tales como liposomas o cápsidas, tal como se describe a continuación. Las suspensiones acuosas pueden incluir agente suspensor, tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y goma de tragacanto, y un agente humectante, tal como lecitina. Los conservantes adecuados para las suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y n-propilo. 45 50

Las composiciones inhibitoras de ROS quinasa también incluyen formulaciones encapsuladas para proteger al producto terapéutico (por ejemplo, un compuesto de ARNbc) frente a la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de transporte microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como vehículos 55 60

farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente de EEUU n.º 4.522.811; publicación PCT WO 91/06309; y publicación de patente europea EP-A-43075. Una formulación encapsulada puede comprender una proteína de la envuelta vírica. La proteína de la envuelta vírica puede derivarse o estar asociada con un virus, tal como un virus de polio, o puede ser parcial o totalmente artificial. Por ejemplo, la proteína de la envuelta puede ser una proteína de virus 1 y/o una proteína de virus 2 del virus del polio, o uno de sus derivados.

La composición inhibidora de ROS también puede comprender un vehículo de transporte, que incluye liposomas, para la administración a un sujeto, portadores y diluyentes y sus sales y/o pueden estar presentes en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se describen métodos para el transporte de moléculas de ácidos nucleicos en Akhtar *et al.*, 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; DELIVERY STRATEGIES FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS, ed. Akhtar, 1995, Maurer *et al.*, 1999, Mol. Membr. Biol., 16, 129-140; Hofland y Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165-192; y Lee *et al.*, 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184-192. Beigelman *et al.*, patente de EEUU n.º 6.395.713 y Sullivan *et al.*, documento PCT WO 94/02595 describen también métodos generales para el transporte de moléculas de ácidos nucleicos. Estos protocolos pueden utilizarse para el transporte de casi cualquier molécula de ácido nucleico.

Los productos terapéuticos inhibidores de ROS pueden administrarse a un tumor de mamífero mediante una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a la encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante la incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o por vectores proteicos (O'Hare y Normand, publicación PCT internacional n.º WO 00/53722). Como alternativa, la combinación de producto terapéutico/vehículo se administra de modo local mediante una inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. La inyección directa de la composición, tanto por vía subcutánea como intramuscular o intradérmica, puede realizarse empleando metodologías de aguja y jeringa convencionales, o mediante tecnologías sin aguja, tales como las descritas en Conry *et al.*, 1999, Clin. Cancer Res., 5,2330-2337, y Barry *et al.*, publicación PCT internacional n.º WO 99/31262.

Las formulaciones farmacéuticamente aceptables de productos terapéuticos inhibidores de ROS quinasa incluyen las sales de los compuestos descritos anteriormente, por ejemplo, sales de adición de ácidos, por ejemplo, sales del ácido clorhídrico, bromhídrico, acético y bencensulfónico. Una formulación o composición farmacológica se refiere a una formulación o composición en una forma adecuada para la administración, por ejemplo, la administración sistémica, en una célula o paciente, que incluye, por ejemplo, un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la vía de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica o mediante inyección. Estas formas no deben evitar que la formulación o composición alcance una célula diana. Por ejemplo, las composiciones farmacológicas inyectadas en la corriente sanguínea deben ser solubles. En la técnica se conocen otros factores, e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y las formas que evitan que la formulación o composición ejerza su efecto.

Las vías de administración que conducen a la absorción sistémica (es decir, la absorción sistémica o acumulación de fármacos en la corriente sanguínea, seguido de la distribución a través de todo el cuerpo) son deseables e incluyen, sin limitación: intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, por inhalación, oral, intrapulmonar e intramuscular. Cada una de estas vías de administración expone el producto terapéutico inhibidor de ROS a un tumor o tejido enfermo accesible. Se ha demostrado que la velocidad de entrada de un fármaco hacia la circulación es una función del peso molecular o tamaño. El uso de un liposoma u otro vehículo de fármaco que comprende los compuestos de la presente invención puede localizar potencialmente el fármaco, en ciertos tipos de tejidos, tales como los tejidos del sistema endotelial reticular (RES). Una formulación de liposomas que puede facilitar la asociación del fármaco con la superficie de las células, tales como linfocitos y macrófagos, también es útil. Esta estrategia puede proporcionar un transporte potenciado del fármaco a las células diana aprovechando la especificidad del reconocimiento inmunológico de los macrófagos y linfocitos de las células anómalas, tales como células del cáncer.

Una "formulación farmacéutica aceptable" significa una composición o formulación que permite la distribución eficaz de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención en la localización física más adecuada para su actividad deseada. Los ejemplos no limitantes de agentes adecuados para la formulación con las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención incluyen: inhibidores de p-glicoproteínas (tales como Pluronic P85), que pueden potenciar la entrada de fármacos en el SNC (Jolliet-Riant y Tillement, 1999, Fundam. Clin. Pharmacol., 13, 16-26); polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(DL-lactida-co-glicólido) para la administración de liberación sostenida después de un implante intracerebral (Emerich *et al.*, 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) (Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.); y nanopartículas cargadas, tales como las fabricadas con polibutilcianoacrilato, que pueden transportar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de captación neuronal (Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry, 23, 941-949, 1999). Otros ejemplos no limitantes de estrategias de transporte para los compuestos inhibidores de ROS útiles en el método de la invención incluyen los materiales descritos en Boado *et al.*, 1998, J. Pharm. Sci., 87, 1308-1315; Tyler *et al.*, 1999, FEBS Lett., 421, 280-284; Partridge *et al.*, 1995, PNAS USA, 92, 5592-5596; Boado, 1995, Adv. Drug Delivery Rev., 15, 73-107; Aldrian-Herrada *et al.*, 1998, Nucleic Acids Res., 26, 4910-4916; y Tyler *et al.*, 1999, PNAS USA, 96, 7053-7058.

Las composiciones terapéuticas que comprenden liposomas con superficie modificada que contienen lípidos de polietilenglicol (modificados con PEG, o liposomas de largo tiempo en circulación o liposomas sigilosos) también

pueden emplearse de modo adecuado en los métodos de la invención. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en tejidos diana. Esta clase de vehículos de fármacos resiste a la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), y por tanto permiten conseguir unos tiempos en la circulación sanguínea más largos y una mayor exposición de los tejidos para el fármaco encapsulado (Lasic *et al.* Chem. Rev., 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 1995, 43, 1005-1011). Estos liposomas han demostrado acumularse selectivamente en tumores, probablemente mediante extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic *et al.*, Science, 1995, 267, 1275-1276; Oku *et al.*, 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Los liposomas de largo tiempo en circulación potencian la farmacocinética y la farmacodinámica del ADN y ARN, en particular comparados con los liposomas catiónicos convencionales, que se sabe que se acumulan en tejidos del MPS (Liu *et al.*, J. Biol. Chem., 1995, 42, 24864-24870; Choi *et al.*, publicación PCT internacional n.º WO 96/10391; Ansell *et al.*, publicación PCT internacional n.º WO 96/10390; Holland *et al.*, publicación PCT internacional n.º WO 96/10392). También es probable que los liposomas de largo tiempo en circulación protejan a los fármacos frente a la degradación por nucleasas en un grado mayor que los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en tejidos de MPS metabólicamente agresivos, tales como el hígado y el bazo.

Las composiciones terapéuticas pueden incluir una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para un uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tintes y agentes aromatizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además, pueden utilizarse antioxidantes y agentes suspensores.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es la dosis necesaria para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar un síntoma hasta cierto grado, preferiblemente todos los síntomas) de un estado de enfermedad. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición utilizada, la vía de administración, el tipo de mamífero que se está tratando, las características físicas del mamífero específico que se está considerando, la medicación concurrente, y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica médica. En general, se administra una cantidad entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal/día de los ingrediente activos, dependiendo de la potencia del polímero cargado negativamente.

Unos niveles de dosificación del orden de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal diarios son útiles en el tratamiento de los trastornos indicados anteriormente (de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente diarios). La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales vehículo para producir una forma de dosificación única varía dependiendo del hospedante tratado y del modo particular de administración. Las formas de dosificación unitaria en general contienen entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo. Se entiende que el nivel de dosis específica para cualquier paciente concreto depende de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta sometida a terapia.

Para la administración a animales no humanos, la composición también puede añadirse al pienso animal o al agua para beber. Puede resultar conveniente formular las composiciones de pienso animal y de agua para beber de modo que el animal ingiera una cantidad terapéuticamente apropiada de la composición junto con su dieta. También puede resultar conveniente presentar la composición como una premezcla para la adición al pienso o al agua para beber.

Un producto terapéutico inhibidor de ROS útil en la práctica de la invención puede comprender un único compuesto, tal como se describió anteriormente, o una combinación de múltiples compuestos, tanto inhibidores de la misma clase (es decir, inhibidor de anticuerpo) como inhibidores de distinta clase (es decir, inhibidores de anticuerpos e inhibidores de molécula pequeña). Esta combinación de compuestos puede aumentar el efecto terapéutico global mediante la inhibición del avance de un cáncer que expresa la proteína de fusión. Por ejemplo, la composición terapéutica puede ser un inhibidor de molécula pequeña, tal como STI-571 (Gleevec®) solo, o en combinación con otros análogos de Gleevec® que se dirigen a la actividad de ROS y/o inhibidores de molécula pequeña de EGFR, tales como Tarceva™ o Iressa™. La composición terapéutica también puede comprender uno o más agentes quimioterapéuticos no específicos además de uno o más inhibidores dirigidos. Estas combinaciones han demostrado recientemente que proporcionan un efecto sinérgico de destrucción del tumor en muchos cánceres. La eficacia de dichas combinaciones para inhibir la actividad de ROS y el crecimiento tumoral *in vivo* puede evaluarse como se describe a continuación.

Identificación de compuestos inhibidores de ROS quinasa mutante

La invención proporciona también, en parte, un método para determinar si un compuesto inhibe el avance de un cáncer caracterizado por una translocación y/o un polipéptido de fusión de CD74-ROS, determinando si el compuesto inhibe la actividad del polipéptido de fusión de CD74-ROS en el cáncer. En algunas realizaciones preferidas, la inhibición de la actividad de ROS se determina estudiando una muestra biológica que comprende

células de la médula ósea, sangre o un tumor. En otra realización preferida, la inhibición de la actividad de ROS se determina empleando al menos un reactivo específico de polipéptido o polinucleótido de ROS mutante de la invención.

5 El compuesto ensayado puede ser cualquier tipo de producto terapéutico o composición, tal como se describió anteriormente. Los métodos para evaluar la eficacia de un compuesto, *in vitro* e *in vivo*, están bien establecidos y son conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición puede ensayarse para su capacidad para inhibir ROS *in vitro* empleando una célula o un extracto celular en el que la ROS quinasa está activada. Puede emplearse un panel de compuestos para ensayar la especificidad del compuesto para ROS (en oposición a otras dianas, tales como EGFR o PDGFR).

10 Otra técnica para la selección de fármacos que puede utilizarse proporciona una selección de alta capacidad de procesamiento de compuestos que tengan una afinidad de unión adecuada con una proteína de interés, tal como se describe en la solicitud PCT publicada WO84/03564. En este método, tal como se aplica a los polipéptidos de ROS mutantes, se sintetiza un gran número de pequeños compuestos de ensayo diferentes sobre un sustrato sólido, tales como varillas de plástico u otra superficie. Los compuestos de ensayo se hacen reaccionar con un polipéptido de ROS mutante, o sus fragmentos, y se lava. Después el polipéptido mutante unido (por ejemplo, el polipéptido de fusión de CD74-ROS) se detecta mediante métodos muy conocidos en la técnica. El polipéptido de ROS mutante purificado también puede revestirse directamente sobre placas para su uso en las técnicas de selección de fármacos mencionadas anteriormente. Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

20 Un compuesto que se ha descubierto que es un inhibidor eficaz de la actividad de ROS *in vitro* después puede estudiarse para su capacidad para inhibir el avance de un cáncer que expresa un polipéptido de fusión de CD74-ROS *in vivo* empleando, por ejemplo, xenoinjertos de mamífero que portan tumores NSCLC humanos que son dirigidos por una proteína de fusión de CD74-ROS. En este procedimiento, líneas celulares conocidas por ser dirigidas por una proteína de fusión de CD74-ROS se implantan de modo subcutáneo en el ratón. Las células después crecen para producir una masa tumoral que puede controlarse de modo visual. Después el ratón puede tratarse con el fármaco. El efecto del tratamiento con el fármaco sobre el tamaño del tumor puede observarse externamente. Después el ratón se sacrifica y el tumor se retira para un análisis mediante IHC y transferencia Western. De modo similar, pueden prepararse trasplantes de médula ósea de mamífero, mediante métodos convencionales, para estudiar la respuesta al fármaco en tumores hematológicos que expresan una ROS quinasa mutante. De esta forma, los efectos del fármaco pueden observarse en un emplazamiento biológico que se parece mucho a un paciente. La capacidad del fármaco para alterar la señalización en las células tumorales o en las células estromáticas circundantes puede determinarse mediante un análisis con anticuerpos específicos de la fosforilación. La eficacia del fármaco para inducir la muerte celular o la inhibición de la proliferación celular también puede observarse mediante un análisis con marcadores específicos de la apoptosis, tales como caspasa 3 rota y PARP rota.

35 Puede determinarse la toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como al proporción de LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que muestran altos índices terapéuticos.

40 Las indicaciones de todas las referencias citadas anteriormente y a continuación se incorporan en la presente como referencia. Los siguientes ejemplos se proporcionan solo para ilustrar más a fondo la invención y no pretenden limitar su alcance, excepto tal como se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención incluye modificaciones y variaciones de los métodos indicados en la presente que son obvias para los expertos en la técnica.

Ejemplo 1: Identificación de la actividad ROS quinasa en pacientes NSCLC mediante formación de perfiles de fosfopéptidos globales

50 El perfil de fosforilación global de la activación de quinasas en varios pacientes NSCLC humanos, que incluye CS042, se estudió empleando una poderosa técnica recientemente descrita para el aislamiento y la caracterización espectrométrica de masas de péptidos modificados incluidos en mezclas complejas (la técnica "IAP", véase Rush *et al.*, *supra*). La técnica IAP se realizó empleando un anticuerpo específico de fosfotirosina (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Beverly, MA, 2003/04 n.º de catálogo 9411) para aislar y posteriormente caracterizar péptidos que contienen fosfotirosina de extractos de las líneas celulares de NSCLC.

55 De modo específico, se empleó la estrategia de IAP para facilitar la identificación de tirosina quinasas activadas en los pacientes con NSCLC, para identificar nuevos conductores de esta enfermedad.

Inmunoprecipitación de fosfopéptidos

Un total de 0,5 g de tejido tumoral se homogeneizó y se lisó en tampón de lisis de urea (HEPES 20 mM, pH 8,0, urea 9 M, vanadato de sodio 1 mM, pirofosfato de sodio 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1 mM) a $1,25 \times 10^8$ células/ml y se

sonicó. Los lisados sonicados se aclararon mediante centrifugación a 20.000 x g, y las proteínas se redujeron y alquilaron tal como se ha descrito previamente (véase, Rush *et al.*, Nat. Biotechnol., 23(1):94-101 (2005)). Las muestras se diluyeron con HEPES 20 mM, pH 8,0, hasta una concentración final de urea de 2 M. Se añadió tripsina (1 mg/ml en HCl 0,001 M) al lisado aclarado a 1:100 en v/v. Las muestras se digirieron durante la noche a temperatura ambiente.

Después de la digestión, los lisados se acidificaron hasta una concentración final de TFA al 1%. La purificación de los péptidos se realizó empleando columnas Sep-Pak C₁₈ según se describió previamente (véase Rush *et al.*, *supra.*). Después de la purificación, todas las eluciones (acetonitrilo al 8%, 12%, 15%, 18%, 22%, 25%, 30%, 35% y 40% en TFA al 0,1%) se reunieron y se liofilizaron. Los péptidos secados se resuspendieron en 1,4 ml de tampón MOPS (MOPS 50 mM/NaOH, pH 7,2, Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 50 mM) y el material insoluble se retiró mediante centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos.

El anticuerpo monoclonal de fosfotirosina P-Tyr-100 (Cell Signaling Technology) procedente de fluido de ascitis se acopló de modo no covalente a esferas de agarosa-proteína G (Roche) a 4 mg/ml de esferas durante la noche a 4 °C. Después del acoplamiento, la resina-anticuerpo se lavó dos veces con PBS y tres veces con tampón MOPS. Se añadió el anticuerpo inmovilizado (40 µl, 160 µg) como una suspensión 1:1 en tampón MOPS IP a la fracción de péptidos solubilizada, y la mezcla se incubó durante la noche a 4 °C. Las esferas de anticuerpos inmovilizados se lavaron tres veces con tampón MOPS y dos veces con ddH₂O. Los péptidos se eluyeron dos veces de las esferas mediante una incubación con 40 µl de TFA al 0,1% durante 20 minutos cada una, y las fracciones se reunieron.

Análisis mediante espectrometría de masas LC-MS/MS

Los péptidos en el eluato de IP (40 µl) se concentraron y se separaron del anticuerpo eluido empleando puntas de extracción Stop and Go (StageTips) (véase, Rappsilber *et al.*, Anal. Chem., 75(3):663-670 (2003)). Los péptidos se eluyeron de las microcolumnas con 1 µl de MeCN al 60%, TFA al 0,1% hacia 7,6 µl de ácido acético al 0,4%/ácido heptafluorobutírico al 0,005% (HFBA). La muestra se cargó en una columna capilar de 10 cm x 75 µm PicoFrit (New Objective) cargada con resina de fase inversa Magic C18 AQ (Michrom Bioresources) empleando un muestreador automático Famos con una válvula de inyección de muestras inerte (Dionex). La columna se reveló con un gradiente lineal de 45 min de acetonitrilo en ácido acético al 0,4%, HFBA al 0,005%, administrado a 280 nl/min (Ultimate, Dionex).

Se recogieron los espectros de masas en tándem de una manera dependiente de los datos con un espectrómetro de masas de atrapamiento de iones LCQ Deca XP Plus (ThermoFinnigan), empleando un método de cuatro superiores, un recuento de repetición de exclusión dinámica de 1, y una duración de la repetición de 0,5 min.

Análisis de la base de datos y asignaciones

Los espectros de MS/MS se evaluaron empleando TurboSequest (ThermoFinnigan) (en el paquete Sequest Browser (v. 27, rev. 12) suministrado como parte de BioWorks 3.0). Los espectros de MS/MS individuales se extrajeron del archivo de datos brutos empleando el programa de Sequest Browser CreateDta, con los siguientes ajustes: PM inferior, 700; PM superior, 4.500; número mínimo de iones, 20; TIC mínimo, 4 x 10⁵; y estado de carga del precursor, no especificado. Los espectros se extrajeron del inicio del archivo de datos brutos antes de la inyección de la muestra al final del gradiente de elución. Los programas Ion Quest y VuDta no se utilizaron para seleccionar después los espectros de MS/MS para el análisis Sequest. Los espectros de MS/MS se evaluaron con los siguientes parámetros de TurboSequest: tolerancia de masas de péptidos, 2,5; tolerancia de iones de fragmentos, 0,0; número máximo de aminoácidos diferenciales por modificación, 4; tipo de masa del progenitor, promedio; tipo de masa del fragmento, promedio; número máximo de sitios de ruptura internos, 10; se consideraron las pérdidas neutras de agua y amoniaco de los iones b e y en el análisis de correlación. Se especificó la enzima proteolítica excepto para los espectros recogidos de las digestiones con elastasa.

Se realizaron búsquedas en la base de datos de NCBI humano emitida el 24 de agosto, 2004 que contiene 27.175 proteínas que permiten una metionina oxidada (M+16) y una fosforilación (Y+80) como modificaciones dinámicas.

En la investigación proteómica, resulta deseable validar las identificaciones de proteínas basándose solamente en la observación de un único péptido en un resultado experimental, para indicar que la proteína, de hecho, está presente en una muestra. Esto ha conducido al desarrollo de métodos estadísticos para validar las asignaciones de péptidos, que aún no están universalmente aceptados, y de líneas directrices para la publicación de los resultados de la identificación de proteínas y péptidos (véase, Carr *et al.*, Mol. Cell Proteomics, 3:531-533 (2004)), que se siguen en este ejemplo. Sin embargo, debido a que la estrategia de inmunoafinidad separa los péptidos fosforilados de los péptidos no fosforilados, la observación de solo un fosfopéptido de una proteína es un resultado habitual, puesto que muchas proteínas fosforiladas solo tienen un sitio de tirosina fosforilada.

Por esta razón, resulta apropiado emplear otros criterios para validar las asignaciones de fosfopéptidos. Es probable que las asignaciones sean correctas si se cumplen cualquiera de estos criterios adicionales: (i) la misma secuencia se asigna a iones coeluyentes con diferentes estados de carga, puesto que el espectro de MS/MS cambia notablemente según el estado de carga; (ii) el sitio se encuentra en más de un contexto de secuencia peptídica debido a que la secuencia se solapa por una proteólisis incompleta o el uso de proteasas distintas de la tripsina; (iii)

el sitio se encuentra en más de un contexto de secuencia peptídica debido a isoformas de proteínas homólogas pero no idénticas; (iv) el sitio se encuentra en más de un contexto de secuencia peptídica debido a proteínas homólogas pero no idénticas entre especies; y (v) sitios validados mediante análisis de MS/MS de fosfopéptidos sintéticos que se corresponden con secuencias asignadas, puesto que el espectrómetro de masas de atrapamiento de iones produce unos espectros de MS/MS muy reproducibles. Este último criterio se emplea habitualmente para confirmar nuevas asignaciones de sitios de particular interés.

Todos los espectros y las asignaciones de secuencias realizadas por Sequest se importaron a una base de datos relacional. Las secuencias asignadas fueron aceptadas o rechazadas según un proceso conservador de dos etapas. En la primera etapa, un subconjunto de asignaciones de secuencias de puntuación alta se seleccionó mediante un filtrado para los valores XCorr de al menos 1,5 para un estado de carga de +1, 2,2 par +2, y 3,3 para +3, permitiendo un valor RSp máximo de 10. Las asignaciones en esta subconjunto se rechazaron si se cumplía cualquiera de los siguientes criterios: (i) el espectro contiene al menos un pico principal (al menos 10% tan intenso como el ion más intenso en el espectro) que no puede cartografiarse en la secuencia asignada como un ion a, b, o y, como un ion que surge de la pérdida neutra de agua o amoníaco de un ion a, b o y, o como un ion de protonación múltiple; (ii) el espectro no contiene una serie de iones b o y equivalentes al menos a seis restos ininterrumpidos; o (iii) la secuencia no se observa al menos cinco veces en todos los estudios que han realizado los inventores (excepto por las secuencias solapantes debidas a una proteólisis incompleta o al uso de proteasas distintas de la tripsina). En la segunda etapa, las asignaciones con unas puntuaciones por debajo del umbral se aceptaron si el espectro de puntuación baja mostraba un alto grado de similitud con un espectro de puntuación alta recogido en otro estudio, que simula una verdadera estrategia de búsqueda en un banco de referencia. Todos los espectros que apoyan la lista final de secuencias asignadas (no se muestra en la presente) fueron analizados por al menos tres científicos para establecer su credibilidad.

Los anteriores análisis de IAP identificaron muchas proteínas con tirosina fosforilada, la mayoría de las cuales eran nuevas. Entre las quinasas con tirosina fosforilada se encontraban varias de las que no se detectan normalmente mediante un análisis de MS en otras líneas celulares de NSCLC (datos sin publicar), que incluyen la ROS quinasa.

Ejemplo 2: Aislamiento y secuenciación del gen de fusión de CD74-ROS

Dada la presencia de la forma activada de ROS quinasa detectada en un paciente con NSCLC, se realizó una amplificación rápida 5' de los extremos del ADNc en la secuencia que codifica el dominio quinasa de ROS, para determinar si estaba presente una transcripción de ROS quimérica.

Amplificación rápida de los extremos del ADN complementario

Se empleó el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) para extraer ARN de la línea celular CS045. El ADN se extrajo con el uso del kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen). La amplificación rápida de los extremos del ADNc se realizó con el uso del sistema 5' RACE (Invitrogen) con los cebadores ROS-GSP1 para la síntesis del ADNc, y ROS-GSP2 y ROS-GSP3 para una reacción de PCR anidada.

Ensayo de PCR

Para la RT-PCR, la primera hebra del ADNc se sintetizó a partir de 2,5 µg del ARN total empleando el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript™ III (Invitrogen) con oligo(dT)₂₀. Después, el gen de fusión de CD74-ROS se amplificó con el uso de parejas de cebadores CD74-F1 y ROS-GSP3:

ROS-GSP1: ACCCTTCTCGGTTCTTCGTTTCCA (SEQ ID NO:7)

ROS-GSP2: GCAGCTCAGCCAACTCTTTGTCTT (SEQ ID NO:8)

ROS-GSP3: TGCCAGACAAAGGTCAGTGGGATT (SEQ ID NO:9)

CD74-F1: GCAGAATGCCACCAAGTATGGCAA (SEQ ID NO:10)

El análisis de la secuencia del producto resultante reveló que el C-terminal de ROS estaba condensado con el N-terminal del gen CD74 (véase la figura 1, panel B y C). El gen de fusión de CD74-ROS estaba dentro de marco y condensa los primeros 208 aminoácidos de CD74 con los últimos 495 aminoácidos de ROS (véase la figura 1, panel B), lo cual resulta en una proteína de fusión. El CD74 se localizó sobre el cromosoma 5q32, mientras que ROS estaba sobre el cromosoma 6q22. Así, se creó el gen de fusión mediante t(5;6)(q32;q22).

La fusión de CD74 y ROS se confirmó mediante una PCR con transcriptasa inversa sobre el ARN. Véase la figura 5.

Ejemplo 3: Detección de la expresión de la proteína de fusión de CD74-ROS en una muestra de cáncer humano empleando un ensayo FISH

La presencia de la proteína de fusión de CD74-ROS en muestras tumorales de NSCLC humanas se detectó empleando un ensayo de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), tal como se ha descrito previamente. Véase,

por ejemplo, Verma *et al.*, HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, Nueva York, N.Y. (1988). Se estudiaron más de 200 muestras de tumor NSCLC humano introducidas en parafina.

5 Para analizar la redistribuciones que implican a ROS, se diseñó una sonda de escisión de dos colores. Una sonda proximal (BAC clon RP1-179P9) y dos sondas distales (BAC clon RP11-323O17, RP1-94G16) se marcaron con naranja Spectrum Orange dUTP o verde Spectrum Green dUTP, respectivamente. El marcaje de las sondas mediante FISH de traducción de mella e interfase empleando secciones de tejidos FFPE se realizó según las instrucciones del fabricante (Vysis) con las siguientes modificaciones. Brevemente, secciones de tejido introducidas en parafina se rehidrataron y se sometieron a una extracción de antígenos con microondas en tampón citrato 0,01 M (pH 6,0) durante 11 minutos. Las secciones se digirieron con proteasa (pepsina 4 mg/ml, 2000-3000 U/mg) durante 10 25 minutos a 37 °C, se deshidrataron y se hibridaron con la sonda FISH ajustada a 37 °C durante 18 horas. Después de lavar, se aplicó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; mg/ml) en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para la contratinción nuclear.

15 La sonda de redistribución de ROS contiene dos sondas marcadas de modo diferente en los lados opuestos del punto de ruptura del gen ROS en la secuencia de tipo salvaje (véase la figura 4B y la figura 1). Cuando se hibrida, la región ROS nativa aparece como una señal de fusión naranja/verde, mientras que la redistribución en este locus (tal como aparece en la proteína de fusión de CD74-ROS) produce señales diferentes naranjas y verdes.

20 El análisis FISH revela una baja incidencia de esta mutación de ROS en la población de muestras estudiada. Dos de los 123 tumores o 1,6% de los tumores contienen la mutación de fusión. Sin embargo, dada la alta incidencia de NSCLC a lo largo del mundo (más de 151.000 casos nuevos en EEUU anuales, solamente), se espera que existirá un número significativo de pacientes que porten esta ROS mutante, y estos pacientes pueden beneficiarse de un régimen terapéutico inhibidor de ROS.

Ejemplo 4: Detección de la expresión de ROS quinasa mutante en una muestra de cáncer humano empleando un ensayo PCR

25 La presencia de ROS quinasa truncada y/o la proteína de fusión de CD74-ROS en una muestra de cáncer humano puede detectarse empleando una reacción en cadena de polimerasa (PCR) de transcriptasa inversa (RT) o genómica, previamente descrita. Véase, por ejemplo, Cools *et al.*, N. Engl. J. Med. 348:1201-1214 (2003).

30 Brevemente y como ejemplo, pueden obtenerse muestras de efusión pleural o de tumor de un paciente que padece NSCLC empleando técnicas convencionales. Se construyen sondas de PCR contra la ROS quinasa truncada o la proteína de fusión de CD74-ROS. Puede utilizarse el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) para extraer el ARN de las muestras de efusión pleural o de tumor. El ADN puede extraerse con el uso del kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Para la RT-PCR, la primera hebra del ADNc se sintetiza, por ejemplo, a partir de 2,5 µg del ARN total empleando, por ejemplo, el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript™ III (Invitrogen) con oligo(dT)₂₀. Después, el gen de fusión de CD74-ROS se amplifica con el uso de parejas de cebadores, por ejemplo, CD74-F1 y ROS-GSP3.

35 Este análisis identificará un paciente que tenga un cáncer caracterizado por la expresión de la ROS quinasa truncada (y/o una proteína de fusión de CD74-ROS), y dicho paciente será un candidato para un tratamiento que emplee un producto terapéutico inhibidor de ROS.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS, y dicha secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2;
- 10 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal de CD74 (restos 1-208 de SEQ ID NO:3) y el dominio quinasa de ROS (restos 1945-2222 of SEQ ID NO:5);
- (d) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos N-terminal de CD74 (nucleótidos 1-624 de SEQ ID NO:4) y la secuencia de nucleótidos del dominio quinasa de ROS (nucleótidos 6032-6865 de SEQ ID NO:6);
- y
- 15 (e) una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de (a)-(d).
- 2.- Un vector recombinante que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 1.
- 3.- Una célula hospedante recombinante que comprende el vector recombinante de la reivindicación 2.
- 4.- Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 20 (a) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1; y
- (b) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de fusión de CD74-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal de CD74 (restos 1-208 de SEQ ID NO:3) y el dominio quinasa de ROS (restos 1945-2222 of SEQ ID NO:5).
- 25 5.- Una pareja de oligonucleótidos, en el que el primer oligonucleótido está en la orientación sentido y el segundo oligonucleótido está en la orientación antisentido, y en el que la pareja de oligonucleótidos amplificará un polinucleótido de fusión de CD74-ROS de la reivindicación 1 o al menos una de sus porciones que incluye la zona de unión de la fusión en una reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- 30 6.- Un péptido aislado que comprende al menos seis aminoácidos contiguos del polipéptido de fusión de CD74-ROS de SEQ ID NO:1, en el que dichos seis aminoácidos contiguos incluyen la zona de unión de la fusión de los restos 208-209 de SEQ ID NO:1, y en el que el péptido aislado es un péptido AQUA, marcado con un isótopo pesado.
- 7.- Un método para detectar la presencia de un polinucleótido de ROS mutante en un cáncer, comprendiendo dicho método detectar un polinucleótido de la reivindicación 1 para determinar si un polinucleótido de fusión de CD74-ROS está presente en una muestra biológica procedente de dicho cáncer.
- 35 8.- El método de la reivindicación 7, en el que dicho cáncer es cáncer de pulmón.
- 9.- El método de la reivindicación 7, en el que el método se aplica en un formato de ensayo de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) o de reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- 10.- Un método para detectar la presencia de un polipéptido de ROS mutante en un cáncer, comprendiendo dicho método detectar un polipéptido de fusión de CD74-ROS de la reivindicación 4 para determinar si un polipéptido de fusión de CD74-ROS está presente en una muestra biológica procedente de dicho cáncer.
- 40 11.- El método de la reivindicación 10, en el que dicho cáncer es cáncer de pulmón.
- 12.- El método de la reivindicación 10, en el que el método se aplica en un formato seleccionado del grupo que consiste en un formato de ensayo de citometría de flujo (FC), de inmunohistoquímica (IHC), y de inmunofluorescencia (IF).
- 45 13.- El método de la reivindicación 10, en el que se detecta la actividad de dicho polipéptido de fusión de CD74-ROS.
- 14.- Un método para determinar si un compuesto inhibe el avance de un cáncer caracterizado por un polinucleótido de fusión de CD74-ROS de la reivindicación 1 y/o un polipéptido de fusión de CD74-ROS de la reivindicación 4,

comprendiendo dicho método la etapa de determinar si dicho compuesto inhibe la expresión y/o la actividad de dicho polipéptido de fusión de CD74-ROS en dicho cáncer.

5 15.- Un kit para la detección de un polinucleótido y/o un polipéptido de fusión de CD74-ROS en una muestra biológica, y dicho kit comprende al menos uno de (i) un polinucleótido de la reivindicación 1; (ii) una pareja de oligonucleótidos de la reivindicación 5, y (iii) un péptido aislado de la reivindicación 6.

10 16.- Un método para detectar la presencia de un polinucleótido de ROS mutante en un cáncer, y dicho método comprende detectar un polinucleótido de la reivindicación 1 empleando una pareja de oligonucleótidos y una reacción en cadena de polimerasa (PCR), en el que el primero oligonucleótido de la pareja está en la orientación sentido y el segundo oligonucleótido de la pareja está en la orientación antisentido, y en el que la pareja de oligonucleótidos amplificará un polinucleótido de la reivindicación 1 o al menos una de sus porciones que incluye la zona de unión de la fusión en la PCR, para determinar si un polinucleótido de fusión de CD74-ROS está presente en una muestra biológica procedente de dicho cáncer.

17.- El método de la reivindicación 16, en el que el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

Figura 1

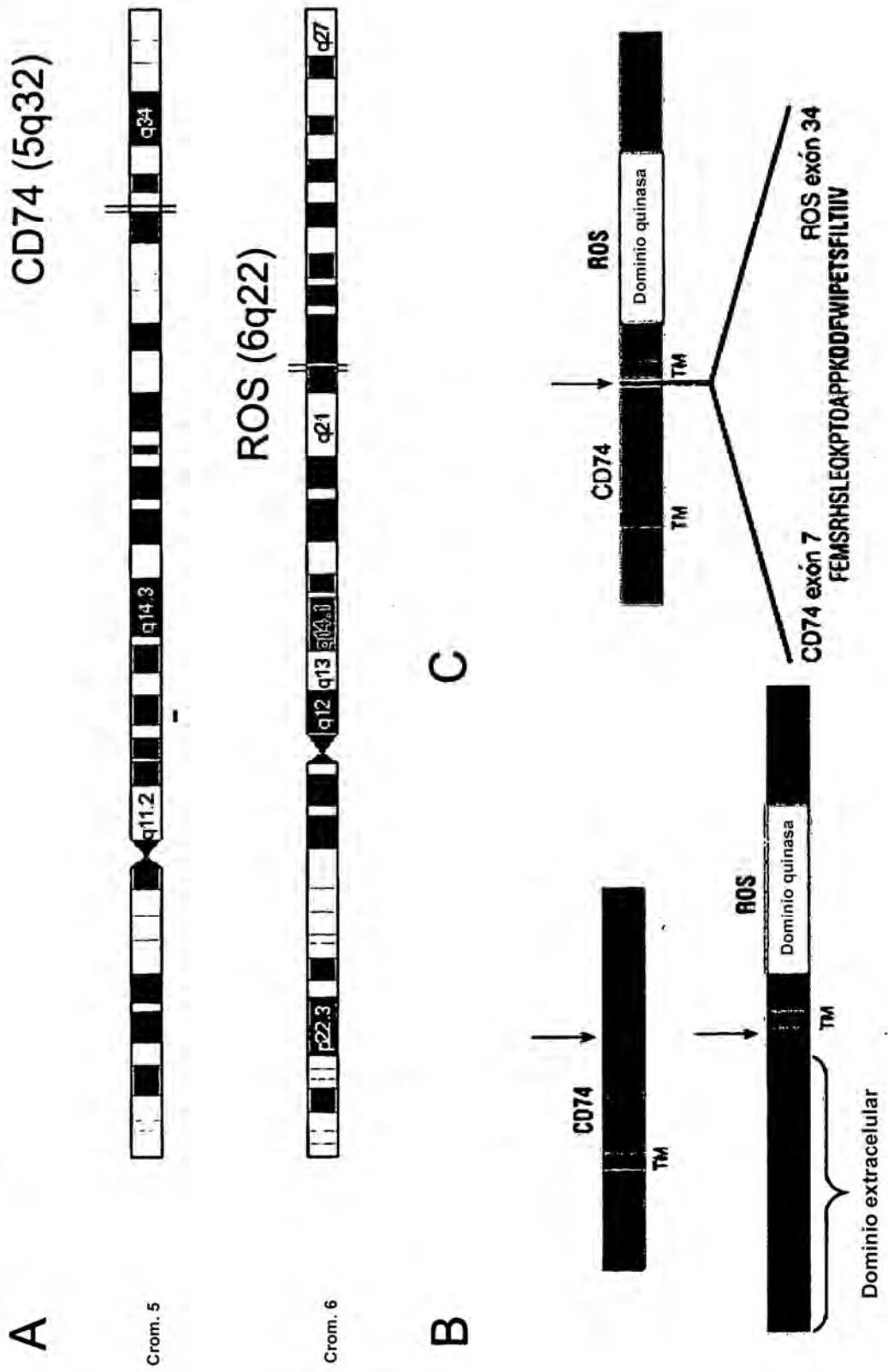


Figura 2

MHRRRSRSCREDQKPVMDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSR GALYT
GFSILVTLLLAGQATTAYFLYQQQGRDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPK PVS
KMRMATPLLMQALPMGALPQGPMQNATKYGNMTE DHVMHLLQNADPLKVYP
PLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRHSLEQKPTD APPK
DDFWIPETSFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRR LKNQKSAKEGVTVLINEDKELAE L
RGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKLTLRLLL GSGAFGEVYEGT
AVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPN ILKQLGVCL
LNEPQYIILEMEGGDLLTYLRKARMAFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGC VYLE
RMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSRIVKIGDFGLARDIYKNDYRKRGE GLLPV
RWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYP AHSNLDV LNIVQTGG
RLEPPRNCPDDLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRIQDQLQLFRNFFL NSIYKSR
DEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVALMETKNREGLNYMVLATE CGQ
GEEKSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGL NYA
CLTHSGYGDGSD

ATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCGGGAAGATCAGAAGCCAGTCAT
GGATGACCAGCGCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACTGCCCATGCTGGG
CCGGCGCCCTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCGCGGAGCCCTGTAC
ACAGGCTTTTCCATCCTGGTGACTCTGCTCCTCGCTGGCCAGGCCACCACC
GCCTACTTCCTGTACCAGCAGCAGGGCCGGCTGGACAACTGACAGTCAC
CTCCCAGAACCTGCAGCTGGAGAACCTGCGCATGAAGCTTCCAAGCCTCC
CAAGCCTGTGAGCAAGATGCGCATGGCCACCCCGCTGCTGATGCAGGCGC
TGCCCATGGGAGCCCTGCCCCAGGGGCCCATGCAGAATGCCACCAAGTAT
GGCAACATGACAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTCCAGAATGCTGACCCC
CTGAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCGGAGAACCTGAGACA
CCTTAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGTCTTTGAGAGCTGGAT
GCACCATTGGCTCCTGTTTGAATGAGCAGGCACTCCTTGGAGCAAAGCC
CACTGACGCTCCACCGAAAGATGATTTTTGGATACCAGAAACAAGTTTCATA
CTTACTATTATAGTTGGAATATTTCTGGTTGTTACAATCCC ACTGACCTTTGT
CTGGCATAGAAGATTAAAGAATCAAAAAAGTGCCAAGGAAGGGGTGACAGT
GCTTATAAACGAAGACAAAGAGTTGGCTGAGCTGCGAGGTCTGGCAGCCG
GAGTAGGCCTGGCTAATGCCTGCTATGCAATACATACTCTTCCAACCCAAGA
GGAGATTGAAAATCTTCCTGCCTTCCCTCGGGAAAAACTGACTCTGCGTCT
CTTGCTGGGAAGTGGAGCCTTTGGAGAAGTGTATGAAGGAACAGCAGTG
GACATCTTAGGAGTTGGAAGTGGAGAAATCAAAGTAGCAGTGAAGACTTT
GAAGAAGGGTTCCACAGACCAGGAGAAGATTGAATTCCTGAAGGAGGCA
CATCTGATGAGCAAATTTAATCATCCCAACATTCTGAAGCAGCTTGGAGTT
TGCTGCTGAATGAACCCCAATACATTATCCTGGA ACTGATGGAGGGAGG
AGACCTTCTTACTTATTTGCGTAAAGCCCGGATGGCAACGTTTTATGGTCC
TTTACTCACCTTGGTTGACCTTGTAGACCTGTGTGTAGATATTTCAA AAG

CTGTGTCTACTTGGAACGGATGCATTTCAATTCACAGGGATCTGGCAGCTAG
AAATTGCCTTGTTCCTGTAAGACTATACCAGTCCACGGATAGTGAAGAT
TGGAGACTTTGGACTCGCCAGAGACATCTATAAAAATGATTACTATAGAAA
GAGAGGGGAAGGCCTGCTCCAGTTCGGTGGATGGCTCCAGAAAGTTTG
ATGGATGGAATCTTCACTACTCAATCTGATGTATGGTCTTTTGGAAATTCTGA
TTTGGGAGATTTTAACTCTTGGTCATCAGCCTTATCCAGCTCATTCCAACCT
TGATGTGTTAAACTATGTGCAAACAGGAGGGAGACTGGAGCCACCAAGAA
ATTGTCCTGATGATCTGTGGAATTTAATGACCCAGTGCTGGGCTCAAGAAC
CCGACCAAAGACCTACTTTTCATAGAATTCAGGACCAACTTCAGTTATTCA
GAAATTTTTCTTAAATAGCATTATAAGTCCAGAGATGAAGCAAACAACAGT
GGAGTCATAAATGAAAGCTTTGAAGGTGAAGATGGCGATGTGATTTGTTTGA
ATTCAGATGACATTATGCCAGTTGCTTTAATGGAAACGAAGAACCGAGAAGG
GTTAAACTATATGGTACTTGCTACAGAATGTGGCCAAGGTGAAGAAAAGTCT
GAGGGTCCTCTAGGCTCCAGGAATCTGAATCTTGTGGTCTGAGGAAAGAA
GAGAAGGAACCACATGCAGACAAAGATTTCTGCCAAGAAAAACAAGTGGCT
TACTGCCCTTCTGGCAAGCCTGAAGGCCTGAACTATGCCTGTCTCACTCAC
AGTGGATATGGAGATGGGTCTGATTA

Figura 3

MHRRRSRSCREDOKPVMDDORDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALY
TGFSILVTLLLAGOATTAYFLYOOQGRDKLTVTSONLOLENLRMKLPKP
PKPVSKMRMATPLLMQALPMGALPOGPMONATKYGNMTEDHVMHLLONAD
PLKVYPPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRHSLEQ
KPTDAPPKVLTKCQEEVSHIPAVHPGSFRPKCDENGNLPLQCYGSIGYC
WCVFPNGTEVPNTRSRRGHHNCSESELEEDPSSGLGVTKQDLGPAPL

CAGGGTCCCAGATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCCGGAAGATCAG
AAGCCAGTCATGGATGACCAGCGCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACT
GCCCATGCTGGGCCCGGCCCTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCGCG
GAGCCCTGTACACAGGCTTTCCATCCTGGTGACTCTGCTCCTCGCTGGC
CAGGCCACCACCGCCTACTTCCTGTACCAGCAGCAGGGCCGGCTGGACAA
ACTGACAGTCACCTCCCAGAACCTGCAGCTGGAGAACCTGCGCATGAAGC
TTCCAAGCCTCCAAGCCTGTGAGCAAGATGCGCATGGCCACCCCGCTG
CTGATGCAGGCGCTGCCATGGGAGCCCTGCCCCAGGGGCCCATGCAGAA
TGCCACCAAGTATGGCAACATGACAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTCC
AGAATGCTGACCCCCTGAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCG
GAGAACCTGAGACACCTTAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGT
CTTTGAGAGCTGGATGCACCATGGCTCCTGTTTCAAATGAGCAGGCACT
CCTGGAGCAAAAGCCCCTGACGCTCCACCGAAAGTACTGACCAAGTGC
CAGGAAGAGGTCAGCCACATCCCTGCTGTCCACCCGGGTTCAATCAGGCC
CAAGTGCGACGAGAACGGCAACTATCTGCCACTCCAGTGCTATGGGAGCA
TCGGCTACTGCTGGTGTGTCTTCCCCAACGGCACGGAGGTCCCCAACACC
AGAAGCCGCGGGCACCATAACTGCAGTGAGTCACTGGAAGTGGAGGACCC
GTCTTCTGGGCTGGGTGTGACCAAGCAGGATCTGGGCCAGCTCCTTTG

Figura 4A

MKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQLDLGTPHNLSEPCIQG
 CHFWNSVDQKNCALKCRESCVEVGCSSAEGAYEEEEVLENADLPTAPFASSIGSHNMTLRWK
 SANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTAQLQLYS
 PPSPSYRTHPHGVPETAPLIRNISSSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLISKNQKLD
 AGTQRTSFQFYSTLPNTIYRFSIAAVNEVGEPEAESSITTSSSAVQQEEQWLFLSRKTS
 LRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKKAANMSDVSDLR
 IFYRGSGLISSISIDWLYQRMFYIMDELVCVCDLENCNSNIEEITPPSISAPQKIVADSYN
 GYVFYLLRDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPQAKRIIYFNDAQVFMST
 FLDGSASHLILPRI PFADVKS FACENND FLVTDGKVI FQQDALS FNEFIVGCDLSHIEEF
 GFGNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPALAIGANVILISDI IELFEL
 GPSAWQNWTYEVKVSTQDPPEVTHIFLNI SGTMLNVPELQSAMKYKVS VRASSPKRPGPW
 SEPSVGTTLVPASEPPFIMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLSSDIGNVSDMDWYNNLSLYS
 DTKGDVFWLLNGTDISENYHLPSIAGAGALAFEWLGHFLYWAGKTYVIQRQSVLTGHTD
 IVTHVKLLVNDMVVDSVGGYLYWTTLYSVESTRLNGESSLVLQTQPWFSGKKVIALTLDL
 SDGLLYWLVDQSQCIHLYTAVLRGQSTGDTTITEFAAWSTSEISQNALMYYSGRFLWING
 FRIITTOEIGQKTSVSVLEPARFNQFTIIQOTSLKPLPGNFSFTPKVIPDSVQESSFRIEG
 NASSFQILWNGPPAVDWGVVYFVSVEFSAHSKFLASEQHS LPVFTVEGLEPYALFNLSVTP
 YTYWGKGPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVL
 KFEI FYNISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVM SFQLEGMSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYA
 DVVKSTTSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNVVWTFSAERVISAVCYTADNEMGYAE
 GDSLFLHLHNRSSSELFQDSLVDITVITIDWISRHL YFALKESQNGMQVFDVDLEHKV
 KYPREVKIHNRNSTIISFSVYPLLSRLYWTEVSNFGYQMFYYSIISHTLHRILQPTATNQ
 QNKRNQCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAKAQEIWAMDLEGCQCWRVITVPAML
 AGKTLVSLTVDGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKNGAIVS QVKALRSRHILAYSSVMQPPF
 DKAFLSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWYGITSPTPTYL VYYAEVNDRKNS
 SDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQIAVKNYSDPLEHLPPGKEIWGKTKNGVPEA
 VQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPNGPKESVRYQLAISHLALI PETPLRQSEFPNGRLTL
 LVTRLSSGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHVPTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQFNWKAPL
 NVNLI RFWVELQWKYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITNLQPYTSYNVRVVVYKTGENST
 SLPESFKTKAGVPNPKGIPKLEGGSKNSIQWEKAEDNGCRITYYILEIRKSTSNLQONQ
 LRWKMTFNGSCSSVCTWKS KNLKGI FQFRVVAANNLGFGGEYS GISENI ILVGDDFWI PET
SFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLLKNQKSAKEGVTVLIN EDKELAE LRGLAAGVGLAN
ACYAIHTLPTQEEIENLPAPPREKLT LRLLLGS GAFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVK
TLKKGSTDOEKIEFLKEAHLMSKFNHPN ILKQLGVCLLNEPQYI ILELMEGGDLTYLRK
ARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTS PRIVKI
GDFGLARDIYKNDYYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGI FTQSDVWSFGIL IWEILT LGHQ
PYPAHSNLDVNLNVYQTGGRLEPPRNC PDDLWNLM TQCWAQEPDQRPTFHRIQNQLQ LFRN
FFLNSIYQCRDEANN SGVINES FEGEDGDVICLN SDDIMPVVMETKNREGLNYMVLATE
CGQGEEKSEGPLGSQESESCGLRKEEKE PHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHS
GYGDGSD

Figura 4B

```

1 caagctttca agcattcaaa ggtctaaatg aaaaaggcta agtattattt caaaaggcaa
61 gtatatccta atatagcaaa acaaacaag caaaatccat cagctactcc tccaattgaa
121 gtgatgaagc ccaataaatt catatagcaa aatggagaaa attagaccgg ccatctaaaa
181 atctgccatt ggtgaagtga tgaagaacat ttactgtctt attccgaagc ttgtcaattt
241 tgcaactctt ggctgcctat ggatttctgt ggtgcagtgt acagtttaa atagctgcct
301 aaagtcgtgt gtaactaatc tgggccagca gcttgacctt ggcacaccac ataactctgag
361 tgaaccgtgt atccaaggat gtcacttttg gaactctgta gatcagaaaa actgtgcttt
421 aaagtgtcgg gagtcgtgtg aggttggctg tagcagcgcg gaaggtgcat atgaagagga
481 agtactggaa aatgcagacc taccaactgc tcccttggct tcttccattg gaagccacaa
541 tatgacatta cgtggaat ctgcaactt ctctggagta aaatacatca ttcagtggaa
601 atatgcacaa cttctgggaa gctggactta tactaagact gtgtccagac cgtcctatgt
661 ggtcaagccc ctgcaacctc tactgagta cattttccga gtggttggga tcttcacagc
721 gcagctgcag ctctactccc ctccaagtcc cagttacagg actcatctc atggagttcc
781 tgaactgca ccttggatta ggaatattga gagctcaagt cccgacactg tggagtcag
841 ctgggatcca cctcaattcc caggtggacc tattttgggt tataacttaa ggctgacag
901 caaaaatcaa aatttagatg cagggacaca gagaaccagt ttccagttt actccacttt
961 accaaatact atctacaggt tttctattgc agcagtaaat gaagtgggtg agggctcaga
1021 agcagaatct agtatacca ctctacttc agcagttcaa caagaggaac agtggctctt
1081 tttatccaga aaaacttctc taagaaagag atcttataaa catttagtag atgaagcaca
1141 ttgcttctgg ttggatgcta tataccataa tattacagga atatctgttg atgtccacca
1201 gcaaatgttt tatttctctg aaggaaactc catatgggcg aagaaggctg ccaacatgtc
1261 tgatgtatct gacctgagaa tttttacag aggttcagga ttaatttctt ctatctccat
1321 agatggctt tatcaaagaa tgtatttcat catggatgaa ctggtatgtg tctgtgattt
1381 agagaactgc tcaaacatcg aggaattac tccacctctc attagtgcac ctcaaaaaat
1441 tgtggctgat tcatacaatg ggtatgtctt ttacctctg agagatggca tttatagagc
1501 agaccttctc gtaccatctg gccggtgtgc agaagctgtg cgtattgtgg agagtgcac
1561 gttaaaggac tttgcaatca agccaagaac caagcgaatc atttacttca atgacactgc
1621 ccaagtcttc atgtcaacat ttctggatgg ctctgcttcc catctcatcc tacctcgeat
1681 ccccttggct gatgtgaaaa gtttggcttg tgaacaacat gacttcttg tcacagatgg
1741 caaggtcatt ttccaacagg atgcttggtc ttttaatgaa ttcacgtgg gatgtgacct
1801 gagtcacata gaagaatttg ggttggtaa cttggtcatc tttggctcat cctcccagct
1861 gcacctctg ccaggccgcc cgcaggagct ttcggtgctg tttggctctc accaggctct
1921 tgttcaatgg aagcctcctg ccctggccat agggaccaat gtcactctga tcagtatat
1981 tattgaactc tttgaattag gcccttctgc ctggcagaac tggacctatg aggtgaaagt
2041 atccacccaa gacctcctg aagtcactca tatttcttg aacataagtg gaaccatgct
2101 gaatgtacct gagctgcaga gtgctatgaa atacaaggtt tctgtgagag caagtctcc
2161 aaagaggcca ggccctggt cagagcctc agtgggtact acctggtgc cagctagtga
2221 accaccattt atcatggctg tgaagaaga tgggcttgg agtaaacat taaatagctt
2281 tggcccagga gagttcttat cctctgatat aggaaatgtg tcagacatgg attggtataa
2341 caacagctc tactacagt acacgaaagg cgacgtttt gtgtggctgc tgaatggac
2401 ggatattctca gagaattatc acctaccag cattgcagga gcagggctt tagctttga
2461 gtggctgggt cacttctct actgggctgg aaagacatat gtgatacaaa ggcagtctgt
2521 gttgacggga cacacagaca ttgttaccca cgtgaagcta ttggtgaatg acatggtgtg
2581 ggattcagtt ggtggatata tctactggac cacactctat tcagtggaaa gcaccagact
2641 aatggggaa agttcccttg tactacagac acagccttg ttttctggga aaaaggtaat
2701 tgctctaact ttagacctca gtgatgggct cctgtattgg ttggttcaag acagtcaatg
2761 tattcacctg tacacagctg ttcttcgggg acagagcact ggggatacca ccatcacaga
2821 atttgcagcc tggagtactt ctgaaatttc ccagaatgca ctgatgtact atagtgtctg
2881 gctgttctgg atcaatggct ttaggattat cacaactcaa gaaataggtc agaaaaccag
2941 tgtctctggt ttggaaccag ccagatttaa tcagttcaca attattcaga catcccttaa
3001 gccctgcca ggaactttt cctttacccc taaggttatt ccagattctg tcaagagtc
3061 ttcatttagg attgaaggaa atgcttcaag ttttcaaatc ctgtggaatg gtccccctgc
3121 ggtagactgg ggtgtagttt tctacagtgt agaatttagt gctcattcta agttcttggc
3181 tagtgaacaa cactctttac ctgtatttac tgtggaagga ctggaacctt atgccttatt
3241 taatctttct gtcactcctt atacctactg gggaaagggc cccaaaacat ctctgtcact
3301 tcgagcacc ttgaacagttc catcagcacc agagaacccc agaatttta tattaccaag
3361 tggaaaatgc tgcaacaaga atgaagttgt ggtggaattd aggtggaaca aacctaaagca
3421 tgaaaaatgg gtgttaacaa aatttgaat tttctacaat atatccaatc aaagtattac
3481 aaacaaaaca tgtgaagact ggattgctgt caatgtcact cctcagtgga tgtctttca
3541 acttgaaggc atgagttcca gatgctttat tgccttccag gttagggcct ttacatctaa
3601 ggggccagga ccatatgctg acgttgtaaa gtctacaaca tcagaaatca acccatctcc

```

Figura 4B (cont.)

3661 tcacctcata actcttcttg gtaacaagat agttttttta gatatggatc aaaatcaagt
 3721 tgtgtggacg ttttcagcag aaagagttat cagtgccgtt tgctacacag ctgataatga
 3781 gatgggatat tatgctgaag gggactcact ctttcttctg cacttgacac atcgctctag
 3841 ctctgagctt ttccaagatt cactggtttt tgatatcaca gttattacaa ttgactggat
 3901 ttcaaggcac ctctactttg cactgaaaga atcacaaaaat ggaatgcaag tatttgatgt
 3961 tgatcttgaa cacaaagtga aatatcccag agaggatgaag attcacaata ggaattcaac
 4021 aataatttct ttttctgtat atcctctttt aagtcgcttg tattggacag aagttccaa
 4081 ttttggctac cagatgttct actacagtat tatcagtcac acctgcacc gaattctgca
 4141 acccagcgt acaaaaccaac aaaacaaaag gaatcaatgt tcttgaatg tgactgaatt
 4201 tgagttaagt ggagcaatgg ctattgatac ctctaaccta gagaacctat tgatatactt
 4261 tgccaaagca caagagatct gggcaatgga tctggaaggc tgtcagtggt ggagagttat
 4321 cacagtacct gctatgctcg caggaaaaac ccttgtagc ttaactgtgg atggagatct
 4381 tataacttgg atcatcacag caaaggacag cacacagatt tatcaggcaa agaaaggaaa
 4441 tggggccatc gtttcccagg tgaaggccct aaggagtagg catatcttgg cttacagttc
 4501 agttatgcag ccttttccag ataaagcgtt tctgtctcta gcttcagaca ctgtggaacc
 4561 aactatactt aatgccacta aactagcct cacaatcaga ttacctctgg ccaagacaaa
 4621 cctcacatgg tatggcatca ccagccctac tccaacatac ctggtttatt atgcagaagt
 4681 taatgacagg aaaaacagct ctgacttgaa atatagaatt ctggaatttc aggacagtat
 4741 agctcttatt gaagatttac aaccttttc aacatacatg atacagatag ctgtaaaaaa
 4801 ttattattca gatcctttgg aacatttacc accaggaaaa gagatttggg gaaaaactaa
 4861 aaatggagta ccagaggcag tgcagctcat taatacaact gtgctgctag acaccagcct
 4921 cattatattc tggagagaat ctcaaacgac aaatggacct aaagaatcag tccgttatca
 4981 gttggcaatc tcacacctgg cctaattcc tgaactcct ctaagacaaa gtgaatttcc
 5041 aaatggaagg ctactctctc ttgttactag actgtctggt ggaatattt atgtgttaaa
 5101 ggttcttggc tggcactctg aggaaatgtg gtgtacagag agtcatcctg tcaactgtga
 5161 aatgtttaac acaccagaga aaccttattc cttggttcca gagaacacta gtttgaatt
 5221 taattggaag gctccattga atgttaacct catcagattt tgggttgagc tacagaagtg
 5281 gaaatacaat gagttttacc atgttaaaac tcatgcagc caaggtcctg cttatgtctg
 5341 taatatcaca aatctacaac cttatacttc atataatgtc agagttagtg tggttataa
 5401 gacgggagaa aatagcacct cacttccaga aagctttaag acaaaaagctg gactccaaa
 5461 taaccaggc attcccaaat tactagaagg gagtaaaaat tcaatacagt gggagaaagc
 5521 tgaagataat ggatgtagaa ttacatacta tatccttgag ataagaaaga gcacttcaa
 5581 taatttacag aaccagaatt taaggtggaa gatgacattt aatggatcct gcagttagt
 5641 ttgcacatgg aagtccaaaa acctgaaagg aatatttcag ttcagagtag tagctgcaaa
 5701 taatctaggg tttggtgaat atagtggaat cagtgagaat attatattag ttggagatga
 5761 tttttggata ccagaacaaa gtttcatact tactattata gttggaatat tcttggttgt
 5821 tacaatccca ctgacctttg tctggcatag aagattaaaag aatcaaaaaa gtgccaagga
 5881 aggggtgaca gtgcttataa acgaagacaa agagttggct gagctgagag gctctggcagc
 5941 cgagtagagg ctggctaatt cctgctatgc aatacatact ctccaaccc aagaggagat
 6001 tgaaaatctt cctgccttcc ctgqggaaaa actgactctg cgtctcttgc tgggaagtga
 6061 agcctttgga gaagtgtatg aaggaacagc agtggacatc ttaggatttg gaagtggaga
 6121 aatcaaaagta gcaqtgaaga ctttgaagaa ggttccaca gaccaggaga agattgaatt
 6181 cctgaaggag gcaatctga tgagcaaat taatcatccc aacattctga agcagcttgg
 6241 agtttctctg ctgaatgaac cccaatacat tatcctggaa ctgatggagg gaggagacct
 6301 tcttacttat ttgcgtaaaag cccggtatgg aacgttttat ggtcctttac tcaccttgg
 6361 tgaccttga gacctgtgtg tagatatttc aaaaggctgt gctacttgg aacggatgca
 6421 tttcattcac agggatctgg cagctagaaa ttgccttgtt tccgtgaaaag actataccag
 6481 tccacggata gtgaagattg gagactttgg actcggcaga gacatctata aaaatgatta
 6541 ctatagaaaag agaggggaaq gctgctccc agttcgggtg atggctccag aaagtttgat
 6601 ggatggaatc ttcactactc aatctgactg atggcttttt ggaattctga tttgggagat
 6661 tttaactctt ggtcatcagc ctatccagc tcattccaac cttgatgtgt taaactatgt
 6721 gcaaacagga gggagactgg agccaccaag aaattgtcct gatgactgtt ggaattta
 6781 gacccagtgc tgggctcaag aacccqacca aagacctact tttcatagaa ttcaggacca
 6841 acttcaqtta ttcagaaatt ttttcttaaa tagcatttat aagtccagag atgaagcaaa
 6901 caacagtggg gtcataaatg aaagctttga aggtgaagat ggcgatgtga tttgtttgaa
 6961 ttcagatgac attatgccag ttgctttta
 7021 tttctgctc gctacagaat gtggccaagg tgaagaaaag tctgaggtc cttaggtctc
 7081 ccaggaatct gaatcttgtg gctcgggaa agaagagaag gaaccacatg cagacaaaga
 7141 tttctgcaa gaaaaacaag tggcttactg ccttcttggc aagcctgaag gctgaaacta
 7201 tgcctgtctc actcacagt gatatggaga tgggtctgat taatagcgtt gtttgggaaa
 7261 tagagagttg agataaacac tctcattcag tagttactga aagaaaactc tctagaatg
 7321 ataaatgtca tgggtgtcta taactccaaa taacaatgc aacgttcc

Figura 5

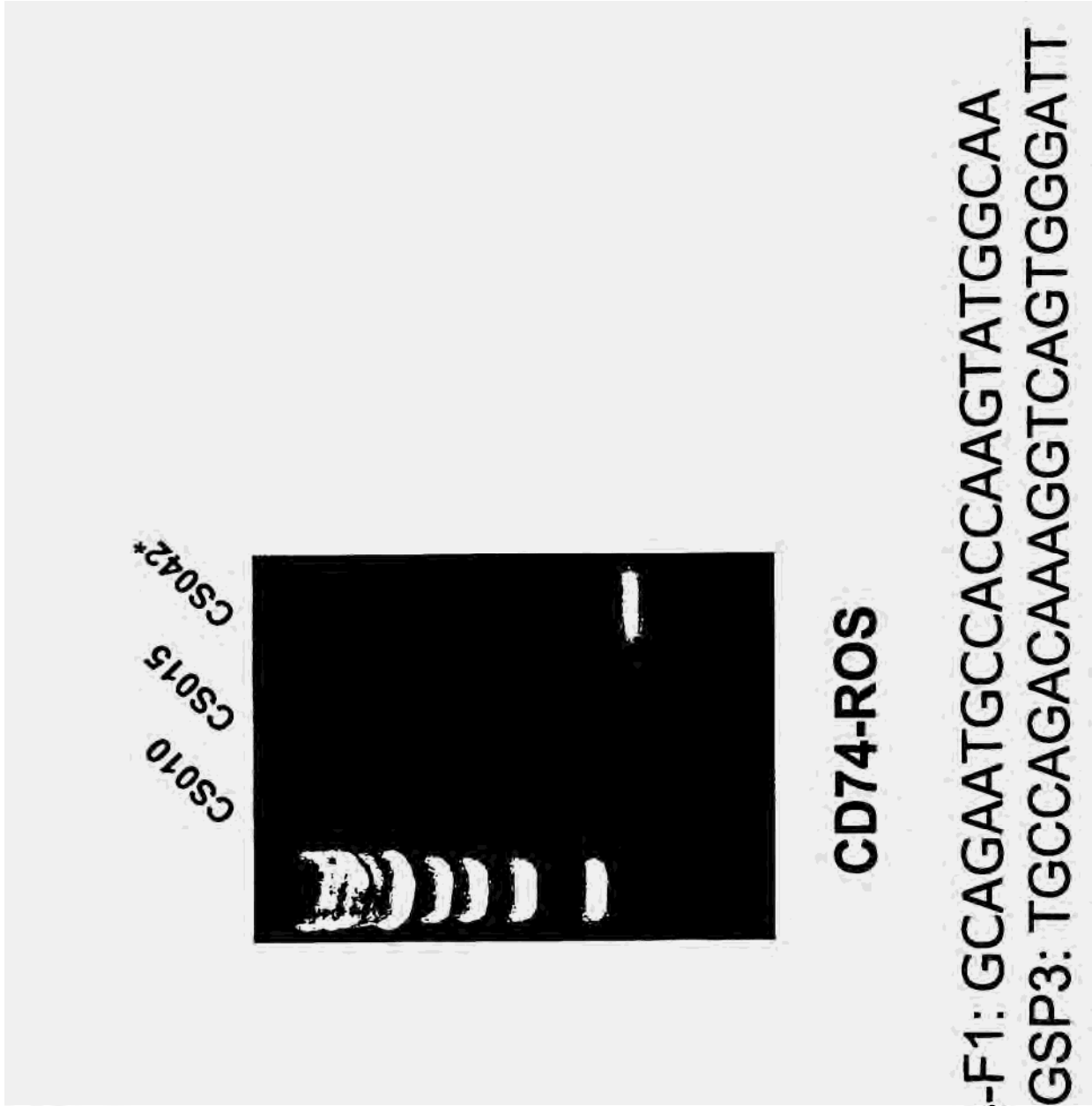


Figura 6

