

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 310**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 31/505** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2011 PCT/US2011/020997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO2011088125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2011 E 11733318 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2524058**

54 Título: **Mutaciones en el gen LNK en pacientes con neoplasia mieloproliferativa y otras neoplasias malignas hematolinfoides**

30 Prioridad:

**14.01.2010 US 295117 P**

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

**21.06.2017**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)  
Office of the General Counsel Building 170, 3rd  
Floor, Main Quad P.O. Box 20386  
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**GOTLIB, JASON, ROBERT;  
NOLAN, GARRY, P.;  
ZEHNDER, JAMES, L. y  
OH, STEPHEN, TRACY**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 618 310 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

Mutaciones en el gen LNK en pacientes con neoplasia mieloproliferativa y otras neoplasias malignas hematolinfoides

**Derechos del Gobierno**

- 5 Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo los contratos NIH U19 AI057229, NIH 0158 G KB065 y NIH 2P01 CA034233-22A1 otorgados por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

**Resumen de la invención**

- 10 Los aspectos de la presente invención incluyen métodos, para cribar a un sujeto para una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide, o como poseer un predisposición o una susceptibilidad más elevada de tener una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide, por determinación de la secuencia del gen LNK, donde la presencia de una variación en la secuencia en comparación con la secuencia de tipo nativo indica que el sujeto tiene una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide o una predisposición o una susceptibilidad más elevada para desarrollar una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide. Los aspectos de la presente invención también incluyen el cribado de los agentes candidatos para el tratamiento de neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide por contacto del agente candidato con una célula que comprende un mutante de LNK y determinando si el agente candidato. Los métodos encuentran uso en una variedad de aplicaciones.

Los aspectos de la invención incluyen además métodos de caracterización y clasificación de una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide y la determinación de una terapia dependiente de la mutación(es) de LNK presente(s).

- 20 Los aspectos de la invención incluyen además un gen (es) LNK mutante (s) y una proteína (s) mutante (s) expresada para el cribado y desarrollo de fármacos, terapia génica y otros usos para prevenir o mejorar los efectos de o resultantes del gen mutante LNK.

**Definiciones**

- 25 Por conveniencia, se recogen aquí ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos, y reivindicaciones adjuntas.

- 30 El término "condiciones de ensayo rigurosas" como se usa aquí se refiere a condiciones que son compatibles para producir pares de unión de ácidos nucleicos, p.ej., ácidos nucleicos unidos a la superficie y en la fase de solución, de suficiente complementariedad para proporcionar el deseado nivel de especificidad en el ensayo siendo menos compatible con la formación de pares de unión entre miembros de unión de complementariedad insuficiente para proporcionar la especificidad deseada. Las condiciones de ensayo rigurosas son la suma o combinación (totalmente) de ambas condiciones de hibridación y de lavado.

- 35 "Las condiciones de hibridación rigurosas" y "condiciones de hibridación y lavado rigurosas" en el contexto de la hibridación de ácido nucleico (p.ej., como en la matriz, hibridación Southern o Northern) son dependientes de la secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros experimentales. Las condiciones de hibridación rigurosas que se pueden usar para identificar ácidos nucleicos dentro del alcance de la invención pueden incluir, p.ej., la hibridación en un tampón que comprende 50% de formamida, 5xSSC, y 1% de SDS a 42°C, o la hibridación en un tampón que comprende 5xSSC y 1% de SDS a 65°C, ambos con un lavado de 0,2xSSC y 0,1% de SDS a 65°C. Condiciones de hibridación rigurosa ejemplares pueden incluir también hibridación en un tampón de un 40% de formamida, NaCl 1 M, y 1% de SDS a 37°C, y un lavado de 1xSSC a 45°C. Alternativamente, se puede emplear la hibridación con DNA unido a un filtro en NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M, 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), EDTA 1 mM a 65°C, y lavando con 0,1xSSC/0,1% SDS a 68°C. Sin embargo las condiciones de hibridación rigurosas adicionales incluyen la hibridación a 60°C o superior y 3xSSC (cloruro de sodio 450 mM/citrato de sodio 45 mM) o la incubación a 42°C en una solución que contiene 30% de formamida, NaCl 1 M, 0,5% de sarcosina de sodio, MES 50 mM, pH 6,5. Aquellos expertos en la técnica reconocerán fácilmente que condiciones de hibridación y lavado alternativas pero comparables se pueden utilizar para proporcionar condiciones de rigurosidad similar.

- 45 En ciertas realizaciones, la rigurosidad de las condiciones de lavado establecen las condiciones que determinan si un ácido nucleico se hibrida específicamente a un ácido nucleico unido a la superficie. Las condiciones de lavado usadas para identificar ácidos nucleicos pueden incluir, p.ej., una concentración de sal de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y una temperatura de al menos aproximadamente 50°C o aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C; o, una concentración de sal de NaCl de aproximadamente 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos; o, una concentración de sal de aproximadamente 0,2xSSC a una temperatura de al menos aproximadamente 50°C o aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos; o, el complejo de hibridación se lava dos veces con una solución con una concentración de sal de aproximadamente 2xSSC que contiene 0,1% de SDS a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se lava dos veces con 0,1xSSC que contiene 0,1% de SDS a 68°C durante 15 minutos; o,

condiciones equivalentes. Las condiciones rigurosas para el lavado pueden ser también, p.ej., 0,2xSSC/0,1% de SDS a 42°C.

5 Un ejemplo específico de condiciones de ensayo rigurosas es la hibridación rotativa a 65°C en un tampón de hibridación basado en la sal con una concentración total de catión monovalente de 1,5 M (p.ej., como se describe en el documento de Patente U.S. No. 09/655,482 presentada el 5 de Septiembre, 2000, cuya discusión se incorpora aquí por referencia) seguido por lavados de 0,5xSSC y 0,1xSSC a temperatura ambiente.

10 Condiciones de ensayo rigurosas son condiciones de hibridación que son al menos tan rigurosas como las condiciones representativas anteriores, donde un conjunto dado de condiciones se consideran que son al menos tan rigurosas si sustancialmente no se producen complejos de unión adicionales que carezcan de complementariedad suficiente para proporcionar la especificidad deseada en el conjunto de condiciones dadas en comparación con las condiciones específicas anteriores, donde "sustancialmente no más" significa menos que aproximadamente 5 veces más, típicamente menos que aproximadamente 3 veces más. Otras condiciones de hibridación rigurosas se conocen en la técnica y se pueden también emplear, según sea apropiado.

15 Como se usa aquí, el término "gen" o "gen recombinante" se refiere a un ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido, incluyendo secuencias de exón y (opcionalmente) secuencias de intrón. El término "intrón" se refiere a una secuencia de DNA presente en el gen dado que no se traduce en la proteína y que se encuentra generalmente entre exones en una molécula de DNA. Además, un gen puede opcionalmente incluir su promotor natural (es decir, el promotor con el que los exones e intrones del gen están enlazados operativamente en una célula no recombinante, es decir, una célula de origen natural), y secuencias reguladoras asociadas, y puede o puede no tener secuencias arriba del sitio de inicio de AUG, y puede o puede no incluir secuencias líderes no traducidas, secuencias señal, secuencias abajo no traducidas, secuencias de inicio y parada de transcripción, señales de poliadenilación, secuencias de inicio y parada de traducción, sitios de unión a ribosomas, y similares.

25 Una "secuencia que codifica una proteína" o una secuencia que "codifica" un polipéptido o péptido particular, es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de DNA) y se traduce (en el caso de mRNA) en un polipéptido *in Vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan mediante un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a, cDNA de mRNA viral, procarriótico o eucariótico, secuencias de DNA genómico de DNA viral, procarriótico o eucariótico, e incluso secuencias de DNA sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción se puede localizar en 3' con respecto a la secuencia codificadora.

35 Los términos "referencia" y "control" se usan indistintamente para referirse a un valor conocido o un conjunto de valores conocidos frente a los que se pueden comparar los datos observados. Como se usa aquí, conocido significa que el valor representa un parámetro entendido, p.ej., una secuencia de tipo nativo de un gen o proteína. Un valor de referencia o control puede ser de un único punto de datos o puede ser un valor calculado en base a más de una medida o punto de datos (p.ej., secuencia de consenso de tipo nativo). Cualquier valor (es) de referencia o de control conveniente se puede emplear en los aspectos prácticos de la presente invención.

40 El término "ácido nucleico" incluye DNA, RNA (bicatenario o monocatenario), análogos (p.ej., moléculas PNA o LNA) y derivados de los mismos. Los términos "ácido ribonucleico" y "RNA" como se usan aquí significan un polímero compuesto de ribonucleótidos. Los términos "ácido desoxirribonucleico" y "DNA" como se usan aquí significan un polímero compuesto de desoxirribonucleótidos. El término "mRNA" significa RNA mensajero. Un "oligonucleótido" se refiere generalmente a un multímero de nucleótidos de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de longitud, mientras que un "polinucleótido" incluye un multímero de nucleótidos que tiene cualquier número de nucleótidos.

45 Los términos "proteína", "polipéptido", "péptido" y similares se refieren a un polímero de aminoácidos (una secuencia de aminoácidos) y no se refiere a una longitud específica de la molécula. Este término se refiere también a o incluye cualquier modificación del polipéptido (p.ej., post-traduccional), tal como glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido, polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no natural.

50 El término "valoración" y "evaluación" se usan indistintamente para referirse a cualquier forma de medición, e incluye la determinación de la identidad de un analito (p.ej., su secuencia) y/o si está presente o no. Los términos "determinación", "medición", "valoración" y "ensayo" se usan indistintamente e incluyen ambas determinaciones cuantitativa y cualitativa. La valoración puede ser relativa o absoluta. "Valorar la presencia de" incluye determinar la cantidad de o identificar un analito en una muestra, así como determinar si está presente o ausente.

55 Los términos "perfil" y "signatura" y "resultado" y "datos", y similares, cuando se usan para describir un nivel peptídico o datos de nivel de expresión génica se usan indistintamente (p.ej., signatura peptídica/perfil/resultado/datos, signatura de expresión génica/perfil/resultado/datos, etc).

"Mutación" como se usa aquí se refiere a una secuencia genética alterada que da como resultado el gen que codifica una proteína que no funciona o una proteína con una función sustancialmente reducida o alterada. Generalmente, una mutación deletérea está asociada con la patología o el potencial para patología.

5 El gen/proteína LNK tiene la siguiente información resumida en la página web del NCBI: GeneID: 10019; Símbolo oficial: SH2B3; Nombre completo oficial: proteína adaptadora 3 SH2B; Fuente primaria: HGNC:29605; Véase Ensembl relacionados: ENSG00000111252, HPRD:05480, MIM:605093; Tipo de gen: codificación de proteínas; Estado de RefSeq: VALIDADO; Organismo: Homo sapiens; También conocido como: LNK; SH2B3.

**Breve descripción de las figuras**

10 Figura 1. Estructura de LNK y localización de las mutaciones. El panel A muestra la estructura de LNK, que incluye un dominio de dimerización rico en prolina N-terminal (Pro/DD), un dominio de homología de Pleckstrin (PH), un dominio SH2, y un residuo de tirosina (Y) conservado en el C-terminal. En el panel B, se muestran las secuencias de DNA de tipo nativo (WT; SEQ ID NO 18) y las formas mutantes de LNK. Las mutaciones están sombreadas en verde. DEL (SEQ ID NO: 19) es una delección de 5 pb y mutación contrasentido (603\_607delGCGCT; 613C>G) que conduce a un cambio de marco y a un codón de parada prematuro (caja roja). 622G>C (SEQ ID NO: 20) es una mutación puntual en el dominio PH. La secuencias de proteínas de WT (SEQ ID NO: 21) y las formas mutantes de LNK se muestran en el panel C. Los cambios de aminoácidos están sombreados en rojo. La mutación DEL conduce a un cambio de marco en el codón 202, seguido por 63 aminoácidos sin sentido y un codón de parada prematuro (SEQ ID NO: 22). Esto da como resultado la ausencia de los dominios PH y SH2. La mutación 622G>C conduce a la sustitución de glutamina por ácido glutámico (E208Q) en el dominio PH (SEQ ID NO: 23). En el panel D, WT y las formas mutantes de LNK se representan esquemáticamente. La posición de la mutación E208Q se indica con un asterisco. Los cromatogramas de secuenciación se muestran en el panel E, demostrando que las mutaciones de LNK están presentes en la sangre (DEL es SEQ ID NO:24; E208Q es SEQ ID NO: 26) pero no en tejido de línea germinal, en este caso fibroblastos de la piel (la secuencia de tipo nativo que corresponde a DEL es SEQ ID NO:25; la secuencia de tipo nativo que corresponde a E208Q es SEQ ID NO: 27), indicando que las mutaciones son somáticas.

30 Figura 2. Las mutaciones de LNK causan crecimiento desregulado dependiente de TPO y activación de JAK2-STAT3/5. Las células BaF3-MPL se transdujeron con un vector vacío (EV), WT LNK (WT), o mutante de LNK (DEL, E208Q, R392E). El panel A muestra el crecimiento de BaF3-MPL durante cuatro días en concentraciones de TPO que van desde 0 a 10 ng/ml. Las células viables se contaron diariamente por tinción con yoduro de propicio (PI) y se cuantificaron con cuentas TruCount en un citómetro de flujo LSRII. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas por muestra. En el panel B, las células BaF3-MPL se estimularon con TPO (1 ng/ml) durante las duraciones indicadas, seguido por la medición de la activación JAK2, STAT3 y STAT5 mediante citometría de flujo fosfo específica. Se muestran los histogramas para las formas fosforiladas de JAK2 (pJAK2), STAT3 (pSTAT3), y STAT5 (pSTAT5), con color interno que representa el cambio múltiple en las intensidades medias de fluorescencia (MFI) comparado con las células no estimuladas (unstim) para cada línea celular. Las líneas rojas indican la MFI de las células no estimuladas EV para su comparación. En el panel C, las células BaF3-MPL se cultivaron en presencia de control de DMSO o concentraciones del inhibidor I de JAK que van desde 0,2 µM a 5 µM. Se muestra el crecimiento acumulativo a los cuatro días (normalizado al crecimiento máximo para cada línea celular). Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas por muestra.

40 Figura 3. Identificación de poblaciones pSTAT3+/pSTAT5+ sensibles a citoquinas en progenitores tempranos CD34+ de pacientes con mutaciones de LNK.

45 Se compararon muestras de sangre periférica de pacientes con mutaciones LNK DEL y E208Q, así como pacientes con PMF con las mutaciones JAK2 V617F y MPL W515L, con donantes normales. En los paneles A-C se muestran células mieloides inmaduras CD3-/CD66-/CD33mid. En el panel A, las muestras se preincubaron con DMSO o inhibidor I de JAK (5µM) durante 30 minutos, y después se estimularon con o TPO (50 ng/ml) o G-CSF (20 ng/ml) durante 15 minutos, antes de evaluar la activación de STAT3 y STAT5 mediante citometría de flujo fosfo-específica. El panel B muestra la tinción de la superficie de CD34 y CD38 para las células pSTAT3+/5+ sensibles a citoquinas ("sensibles") del DEL, en comparación con las células no sensibles (incluye todas las células distintas de las células pSTAT3+/5+). Las células sensibles a citoquinas se muestran en verde (TPO) y rojo (G-CSF). Para los paneles A y B, los números representados en cada cuadrante representan el porcentaje de células totales presentes en cada puerta del cuadrante. En el panel C, se cuantificó la frecuencia de células CD34+ sensibles a citoquinas y se mostró como un cambio múltiple frente a un donador normal. En el panel D, PBMCs de DEL se estimularon con G-CSF, y se clasificaron seis subgrupos por FACS, según lo definido por los marcadores de superficie y las proteínas fosforiladas STAT que se muestran en la tabla. No aplicable (n/a) indica marcadores de superficie que no se usan para delinear ese subgrupo específico. El DNA se aisló de cada subgrupo, y se realizó una PCR cuantitativa específica de alelo para la mutación DEL. Se muestra la carga de alelo para cada subgrupo. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

Figura 4. Cambio múltiple para la activación de JAK2, STAT3, y STAT5 en células BaF3-MPL estimuladas con TPO. Las MFI para cada punto de tiempo se normalizaron para células no estimuladas (0 min) para cada línea celular y se representó como cambio múltiple. Este dato se muestra visualmente como histogramas en la Fig 2B.

5 Figura 5. La activación de JAK2-STAT3/5 en células BaF3-MPL que expresan WT o mutaciones de LNK requiere actividad de JAK. Las células BaF3-MPL que expresan WT o mutaciones de LNK se preincubaron con DMSO o inhibidor I de JAK a concentraciones que van desde 0,2  $\mu$ M a 5  $\mu$ M durante dos horas antes de estimularlas con TPO (10 ng/mL). La activación de JAK2, STAT3, y STAT5 se midió después mediante citometría de flujo fosfo-específica. Los gráficos de líneas representan el % de activación máxima para cada línea celular.

10 Figura 6. Estrategia de cierre anterior para Fig 3A-C. Las mellas se cerraron en base a la dispersión delantera y lateral. CD3 y CD66 se usaron después para eliminar las células T y granulocitos, respectivamente. Estudios iniciales indicaron que las células CD33hi eran CD14+ (monocitos maduros) y no mostraban fosforilación de STAT3/5 en respuesta a TPO y/o G-CSF. Las células CD33 mid eran CD14- (células mieloides inmaduras) y fueron usadas por tanto para el análisis de pSTAT3 y pSTAT 5.

15 Figura 7. Estructura de dominio de LNK de tipo nativo y mutante. (A) LNK de tipo nativo tiene 575 aminoácidos y consiste en un dominio rico en prolina N-terminal y un dominio de dimerización (Pro/DD), un dominio de homología de Pleckstrin (PH) importante para dirigirse a la membrana plasmática, un dominio SH2 que interactúa con MPL y JAK2, y un residuo de tirosina (Y) conservado en el extremo C-terminal. (B) El mutante DEL contiene una delección de 5 pb y una mutación contra sentido, que conduce a un codón de parada prematuro y a una proteína truncada de 264 aminoácidos. El mutante E208Q contiene una mutación puntual que da lugar a la alteración de la glutamina a ácido glutámico en el aminoácido 208, situado al principio del dominio PH. (C) Se ha mostrado que el mutante R392E interrumpe el dominio SH2 y suprime la capacidad de LNK para inhibir la señalización y proliferación mediadas por TPO (Gery y colaboradores, Blood 2007). El mutante PH/SH2 pierde la habilidad de localizarse en la membrana plasmática (Gery y colaboradores, Blood 2007). El mutante dPH/R364E/dC ejerce un efecto negativo dominante en LNK de tipo nativo (Takizawa y colaboradores, Blood 2006).

## 25 Descripción de las realizaciones específicas

Antes de que la presente invención se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. Se debe entender también que la terminología usada aquí es solo con el propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

30 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende por cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite más bajo a menos que el contexto dicte lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, esté comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y están también comprendidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos se incluyen también en la invención.

35 Ciertos intervalos se presentan aquí con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se usa aquí para proporcionar el soporte literal para el número exacto que lo precede, así como un número que está cerca a o aproximado al número que el término precede. Para determinar si un número está cerca de o aproximado a un número indicado específicamente, el número cercano o aproximado no indicado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporcione el equivalente sustancial del número indicado específicamente.

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención. Aunque algunos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden usar también en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales ilustrativos representativos.

45 Todas las publicaciones y patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan aquí por referencia como si cada publicación o patente individual estuviese específica e individualmente indicada para incorporarse como referencia y se incorporan aquí por referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales con respecto a los cuales se citan las publicaciones. La citación de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debería interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anticiparse a tal publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

55 Se observa que, como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Se observa además que las

reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como antecedente base para el uso de dicha terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares en relación con la recitación de elementos de reclamación, o el uso de una limitación "negativa".

- 5 Como resultará evidente para aquellos expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas aquí tiene componentes y características discretos que se pueden separar fácilmente de o combinar con las características de las otras varias realizaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método recitado puede llevarse a cabo en el orden de los acontecimientos indicados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

**Métodos para el diagnóstico y prevención de neoplasias o neoplasias malignas hematolinfoides**

- 10 Los aspectos de la presente invención incluyen métodos de cribado genético para determinar la presencia de o una predisposición a la neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide, que comprende:

determinar la secuencia de un gen LNK derivado de una muestra del sujeto, donde la muestra del sujeto comprende células sanguíneas; y

- 15 clasificar el sujeto que tiene o está predispuesto a la neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide si la secuencia de LNK determinada tiene al menos una mutación, donde la mutación de LNK está dentro de los dominios de homología de Pleckstrin (PH) y/o homología 2 de Src (SH2) y/o da como resultado la delección de todo o una parte de los dominios PH y/o SH2. En ciertas realizaciones, la mutación de LNK da como resultado un incremento en la señalización de citoquinas en una célula en comparación con LNK de tipo nativo. En ciertas realizaciones, la mutación de LNK se selecciona de: E208Q y 603\_607delGCGCT;613C>G.

- 20 En ciertas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre.

En ciertas realizaciones, la neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide es una neoplasia mieloproliferativa negativa JAK2 V617F (MPN).

En ciertas realizaciones, la etapa de clasificación comprende comparar la secuencia LNK determinada con una o más secuencias LNK de referencia, donde la una o más secuencias LNK de referencia incluyen uno o ambos de:

- 25 una secuencia LNK de un sujeto que se sabe que está predispuesto a una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide; y

una secuencia LNK de un sujeto que se sabe que no está predispuesto a una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide.

- 30 Se puede emplear cualquier método conveniente para determinar la secuencia de un ácido nucleico o proteína LNK, y como tal no se pretende ninguna limitación a este respecto. En ciertas realizaciones, la etapa de determinación comprende una o más de las siguientes: PCR, hibridación de ácido nucleico, análisis de secuenciación, y ensayo de unión a anticuerpos.

- 35 Los métodos de la presente descripción son adecuados para la preparación de un informe que proporcione un resultado o puntuación resultante de los métodos de la presente descripción. Un "informe" como se describe aquí, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos de informe que proporcionan información de interés relacionada con el diagnóstico o evaluación del riesgo y sus resultados (p.ej., un resultado de mutación de LNK y probabilidad de tener o desarrollar una neoplasia/neoplasia maligna). Un informe de la materia se puede generar completa o parcialmente electrónicamente, p.ej., presentado en una pantalla electrónica (p.ej., monitor de ordenador). Un informe puede además incluir uno o más de: 1) información sobre la instalación de ensayo; 2) información sobre el proveedor de servicio; 3) datos del paciente; 4) datos de la muestra; 5) un informe interpretativo, que puede incluir varias informaciones incluyendo: a) indicación; b) datos de ensayos genéticos y 6) otras características.

- 45 La presente descripción, por lo tanto, proporciona métodos para crear informes y los informes resultantes de los mismos. El informe se puede presentar en formato electrónico o en papel, y se le puede proporcionar al paciente o al proveedor de atención médica al paciente. En ciertas realizaciones, el método descrito aquí puede incluir además una etapa de generación o emisión de un informe de los resultados de los métodos detallados aquí a un usuario, p.ej., un paciente o un proveedor de atención médica. Una persona o entidad que prepara un informe ("generador de informes") puede realizar también una evaluación de la fecha del mismo. El generador de informes puede realizar también una cualquiera o más de las etapas del proceso, p.ej., recolección de las muestras, procesamiento de las muestras, y generación de datos. Alternativamente, una entidad distinta del generador de informes puede realizar
- 50 una o más recolección de muestras, procesamiento de muestras, y generación de datos.

En ciertas realizaciones, p.ej., cuando los métodos se ejecutan completamente en un único ordenador, el usuario o cliente proporciona la entrada de datos y la revisión de la salida de datos. Un "usuario" puede ser un profesional de la salud (p.ej., un clínico, un técnico de laboratorio, un médico (p.ej., oncólogo, cirujano, patólogo), etc.).

5 En realizaciones en las que el usuario solo ejecuta una parte del método, el individuo que, después del procesamiento de los datos computerizados de acuerdo con los métodos de la invención, revisa la salida de los datos (p.ej., los resultados antes de la liberación para proporcionar un informe completo, un informe "incompleto" y proporciona la intervención manual y la terminación de un informe interpretativo) se refiere aquí como un "revisor". El revisor puede situarse en un lugar distante al usuario (p.ej., en un servicio proporcionado separado de los centros médicos donde el usuario está localizado).

10 Cuando se aplican las regulaciones gubernamentales y otras restricciones (p.ej., requisitos de salud, negligencias, o seguro de responsabilidad civil), todos los resultados, generados total o parcialmente electrónicamente, pueden someterse a una rutina de control de calidad antes de ser liberados al usuario.

#### Cribado de fármacos

15 Aspectos de la presente invención incluyen métodos para identificar un agente terapéutico candidato para uso en un medicamento para tratar la neoplasia o neoplasia maligna hematolinfóide en un sujeto, el método comprende:

poner en contacto una célula que comprende una proteína LKN que tiene una mutación dentro de los dominios de homología de Pleckstrin (PH) y/o de homología Src2 (SH2), y/o una mutación que da como resultado una delección de todo o parte de los dominios PH y/o SH2 con un agente; e

20 identificar el agente como un agente terapéutico candidato para el tratamiento de neoplasia o neoplasia maligna hematolinfóide en un sujeto si el agente reduce la señal de citoquinas en la célula en comparación con un control.

En ciertas realizaciones, la mutación de LKN se selecciona de: E208Q y 603\_607delGCGCT; 613C>G. En ciertas realizaciones, la neoplasia o neoplasia maligna hematolinfóide es una neoplasia mieloproliferativa negativa *JAK2* V617F (MPN).

25 En ciertas realizaciones, la etapa de contacto comprende además poner en contacto la célula con una citoquina. En ciertas realizaciones, la citoquina es TPO.

#### Métodos de tratamiento, agentes terapéuticos y composiciones farmacéuticas de los mismos

30 Se describe el tratamiento de un sujeto que tiene neoplasia o neoplasia maligna hematolinfóide, que comprende administrar una cantidad efectiva del agente que inhibe la mutación mediada de LKN que aumenta la señalización de citoquinas (p.ej., desde la señalización de TPO). En tales realizaciones, el agente bloquea la activación de STAT3 y/o STAT5 mediada por LNK mutante.

35 Formulaciones farmacéuticas de agentes terapéuticos se pueden optimizar para la retención y estabilización en un sitio específico. Las técnicas de estabilización incluyen aumentar el tamaño del polipéptido, por reticulación, multimerizar, o unirse a grupos tales como polietilenglicol, poliácridamida, portadores de proteínas neutros, etc. con el fin de lograr un aumento del peso molecular. Otras estrategias para aumentar la retención incluyen el atrapamiento del polipéptido en un implante biodegradable o bioerodible. La velocidad de liberación del agente terapéuticamente activo está controlada por la velocidad de transporte a través de la matriz polimérica, y la biodegradación del implante. El transporte del polipéptido a través de la barrera del polímero se afectará también por la solubilidad del compuesto, hidrofiliidad del polímero, grado de reticulación del polímero, expansión del polímero tras la absorción de agua para hacer la barrera de polímero más permeable al fármaco, geometría del implante, y similares. Los implantes son de dimensiones acordes con el tamaño y la forma de la región seleccionada como el sitio de la implantación. Los implantes pueden ser partículas, láminas, parches, placas, fibras, microcápsulas y similares y pueden ser de cualquier tamaño o forma compatible con el sitio de inserción seleccionado.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores farmacéuticamente aceptables, no tóxicos de diluyentes, que se definen como portadores normalmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son el agua destilada, agua tamponada, solución salina fisiológica, PBS, solución de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir otros portadores, adyuvantes, o no tóxicos, no terapéuticos, estabilizantes no inmunogénicos, excipientes y similares. Las composiciones pueden incluir también sustancias adicionales para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y agentes de tampón, agentes de ajuste de la toxicidad, agentes humectantes y detergentes.

La composición puede incluir también cualquiera de una variedad de agentes estabilizantes, tales como por ejemplo un antioxidante. El polipéptido puede formar un complejo con varios compuestos conocidos que mejoran la

estabilidad *in vivo* del polipéptido, o por otra parte mejoran sus propiedades farmacológicas (p.ej., aumentan la vida media del polipéptido, reducen su toxicidad, aumentan la solubilidad o absorción). Ejemplos de tales modificaciones o agentes complejantes incluyen sulfato, gluconato, citrato y fosfato. Los polipéptidos de una composición pueden también formar complejos con moléculas que mejoran sus atributos *in vivo*. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, 5 carbohidratos, poliaminas, aminoácidos, otros péptidos, iones (p.ej., sodio, potasio, calcio, magnesio, manganeso), y lípidos.

Más orientación con respecto a las formulaciones que son adecuadas para varios tipos de administración se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos para la administración de los fármacos, véase, Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. La toxicidad y la eficacia terapéutica del ingrediente activo se puede determinar de acuerdo con procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares y/o animales de experimentación, incluyendo, por ejemplo, determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que presentan índices terapéuticos grandes.

Los datos obtenidos a partir del cultivo celular y/o estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para humanos. La dosis del ingrediente activo se alinea típicamente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con toxicidad baja. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada.

Las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden administrar en una variedad de diferentes maneras. Ejemplos incluyen administrar una composición que contiene el portador farmacéuticamente aceptable vía oral, intranasal, rectal, tópica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, subdérmica, transdérmica, intratecal, y métodos intracraneales.

Formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, y subcutánea, incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor, y las suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes.

Los componentes usados para formular las composiciones farmacéuticas son preferiblemente de pureza alta y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente nocivos (p.ej., al menos grado National Food (NF), generalmente al menos grado analítico, y más típicamente al menos grado farmacéutico). Por otra parte, las composiciones destinadas para uso *in vivo* son normalmente estériles. En la medida en que un compuesto dado tiene que ser sintetizado antes de su uso, el producto resultante está típicamente sustancialmente libre de cualquier agente potencialmente tóxico, en particular cualquier endotoxina, que puede estar presente durante el proceso de síntesis o purificación. Composiciones para administración parental son también estériles, sustancialmente isotónicas y realizadas bajo condiciones GMP.

#### Bases de datos de perfiles de expresión de genes determinantes de fenotipos

También se describen bases de datos de secuencias de genes LNK y su asociación con neoplasias y neoplasias malignas hematolinfoides. Las secuencias y las asociaciones correspondientes se pueden proporcionar en una variedad de medios para facilitar su uso (p.ej., en un formato legible/accesible al usuario). El "medio" se refiere a una fabricación que contiene la información del perfil de expresión de la presente invención. Las bases de datos de la presente invención se pueden grabar en medios legibles por ordenador, p.ej., cualquier medio que se pueda leer y acceder directamente por un usuario que emplee un ordenador. Tal medio incluye, pero no se limita a: medio de almacenamiento magnético, tal como disquetes, medio de almacenamiento en disco duro, y cinta magnética; medio de almacenamiento óptico tal como CD-ROM; medio de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM; y híbridos de estas categorías tal como medio de almacenamiento magnético/óptico. Un experto en la técnica puede apreciar rápidamente como cualquiera de los medios legibles por ordenador conocido actualmente se puede usar para crear una fabricación que comprenda un registro de la información presente en la base de datos. "Grabado" se refiere a un proceso para almacenar la información en un medio legible por ordenador, usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Se puede elegir cualquier estructura de almacenamiento de datos conveniente, en base a los medios utilizados para acceder a la información almacenada. Se pueden usar una variedad de programas y formatos de procesador de datos para el almacenamiento, p.ej., archivo de texto del procesamiento de texto, formato de base de datos, etc. Por lo tanto, las bases de datos de los perfiles de expresión del sujeto son accesibles por el usuario, es decir, los archivos de bases de datos se guardan en un formato legible por el usuario (p.ej., un formato legible por ordenador, donde el usuario controla el ordenador).

5 Como se usa aquí, "un sistema basado en ordenador" se refiere a los medios de hardware, medios de software, y medios de almacenamiento de datos usados para analizar la información de la presente invención. El hardware mínimo de los sistemas basados en ordenador de la presente invención comprende una unidad de procesamiento central (CPU), medios de entrada, medios de salida, y medios de almacenamiento de datos. Un experto en la técnica puede apreciar rápidamente que uno cualquiera de los sistemas basados en ordenador disponibles actualmente es adecuado para uso en la presente invención. Los medios de almacenamiento de datos puede comprender cualquier fabricación que comprenda un registro de la presente invención como se describió anteriormente, o un medio de acceso a la memoria que pueda acceder tal fabricación.

10 Como tal, la presente invención incluye además un producto de programa de ordenador para determinar si el sujeto tiene o está predispuesto a tener una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfóide. El producto de programa de ordenador, cuando se carga en un ordenador, se configura para emplear un gen LKN o secuencia de proteínas de células sanguíneas que contiene la muestra para determinar neoplasia hematolinfóide o categoría de neoplasia maligna para el sujeto. Una vez determinada, la neoplasia hematolinfóide o la categoría neoplasia maligna se proporciona a un usuario en un formato legible por el usuario. Además, el producto del programa de ordenador puede incluir una o más referencias o secuencias LNK de control que se emplean para determinar la categoría de trasplante clínico del paciente.

#### Reactivos, sistemas y kits

20 También se describen reactivos, sistemas y kits de los mismos para la práctica de uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos, sistemas y kits de los mismos presentes pueden variar en gran medida. Los reactivos de interés incluyen reactivos diseñados específicamente para uso en la determinación de secuencias de ácidos nucleicos y/o proteínas LNK. El término sistema se refiere a una colección de reactivos, sin embargo compilado, p.ej., mediante la compra de una colección de reactivos desde las mismas o diferentes fuentes. El término kits se refiere a una colección de reactivos proporcionada, p.ej., que se vende, juntos.

25 Reactivos adaptados específicamente para determinar una secuencia de un gen o proteína LKN incluye una colección de cebadores o sondas específicas de LKN, al menos una de las cuales está diseñada para detectar y/o amplificar selectivamente un gen mutante LKN/cDNA (etc.) (p.ej., usando ensayos de hibridación, una técnica basada en PCR, amplificación lineal, etc.). Los sistemas y kits de la presente invención pueden incluir un anticuerpo específico para una secuencia de aminoácidos mutante (p.ej., para un ensayo de cribado positivo) o para una secuencia conocida para ser eliminada en un LNK mutante (p.ej., en un ensayo de cribado negativo). Los sistemas y kits pueden incluir además uno o más reactivos adicionales empleados en varios métodos, tales como cebadores para la generación ácidos nucleicos diana, dNTPs y/o rNTPs, que pueden premezclarse o separarse, uno o más dNTPs y/o rNTPs marcados singularmente, tales como dNTPs biotinilados o marcados en Cy3 o Cy5, partículas de oro o plata con diferentes espectros de dispersión, u otro reactivo de marcaje posterior a la síntesis, tal como derivados químicamente activos de colorantes fluorescentes, enzimas de anticuerpos primarios y secundarios (incluyendo anticuerpos marcados), tales como transcriptasas inversas, DNA polimerasas, RNA polimerasas, y similares, varios medios tampón, p.ej., tampones de hibridación y lavado, sondas de matriz/sustrato prefabricados, reactivos y componentes de sonda marcada, como columnas de centrifugación, etc., reactivos de generación y detección de señales, p.ej., estreptavidina- conjugado de fosfatasa alcalina, sustrato quimiofluorescente o quimioluminiscente, y similares.

40 Los sistemas y kits presentes pueden incluir también reactivos para la determinación del nivel de péptidos o proteínas, por ejemplo los que encuentran uso en los ensayos de ELISA, ensayos de Western blot, ensayos MS (p.ej., LC-MS), ensayos de HPLC, ensayos de citometría de flujo, y similares.

45 Los sistemas y kits presentes pueden incluir también un elemento de determinación de fenotipo, cuyo elemento es, en muchas realizaciones, secuencias referencia o control que se pueden emplear, p.ej., mediante medios informáticos adecuados, para determinar una neoplasia hematolinfóide o categoría maligna para un sujeto en base a una secuencia de ácido nucleico o proteína de entrada de tinta.

50 Además de los componentes anteriores, los kits presentes incluirán además instrucciones para la práctica de los métodos presentes. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits presentes en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p.ej., una pieza o piezas de papel en el que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un prospecto, etc. Otro medio sería un medio legible por ordenador, p.ej., disquete, CD, etc., en el que se ha grabado la información. Otro medio en el que se puede presentar es una dirección de página web que se puede usar a través de internet para tener acceso a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

55 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## Experimental

### Resumen

LNK es una proteína adaptadora que inhibe la trombopoyetina (TPO) y JAK2. Aquí mostramos nuevas mutaciones de *LNK* en dos pacientes con neoplasias mieloproliferativas negativas *JAK2* V617F. Un paciente exhibió delección de 5 pares de bases y mutación en contra sentido que conduce a un codón de parada prematuro y a la pérdida de los dominios de homología de Pleckstrin (PH) y SH2. Un segundo paciente tuvo una mutación contra sentido (E208Q) en el dominio PH. Las células BaF3-MPL transducidas con estos LNK mutantes muestran crecimiento y señalización desregulada dependiente de TPO. Las células CD34+ sensibles a citoquinas fueron anormalmente abundantes en ambos pacientes. Por lo tanto, la pérdida de regulación de la retroalimentación negativa de LNK conduce a señalización aberrante JAK-STAT y constituye un nuevo mecanismo de patogénesis MPN.

### Introducción

La señalización aberrante debido a la activación de mutaciones en tirosina quinasas es un sello distintivo de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (MPNs). La mutación V617F en el exón 14 de *JAK2* se ha descrito en > 95% de pacientes con policitemia vera (PV), y aproximadamente en un 50% de pacientes con trombocitemia esencial (ET) y mielofibrósisis primaria (PMF) (refs 1-4). Las mutaciones de ganancia de función en exón 12 del gen *JAK2* se han encontrado en una pequeña minoría de pacientes PV sin la mutación V617F (ref. 5), y la activación de las mutaciones en el receptor *MPL* (W515K/L) de la trombopoyetina (TPO) se ha identificado en aproximadamente un 5% de los pacientes con PMF y ET negativas *JAK2* V617F (refs. 6, 7). Por lo tanto, aproximadamente el 40-50% de los pacientes ET y PMF carecen de una anomalía genética definida. Incluso en ausencia de mutaciones *JAK2* o *MPL*, la activación de la señalización JAK-STAT se puede mostrar en algunos pacientes MPN (refs. 8-10), lo que sugiere que alteraciones de otros elementos reguladores en esta vía pueden contribuir a la patogénesis MPN.

Un regulador de la señalización JAK-STAT es LNK (SH2B3), un miembro de una familia de proteínas adaptadoras que comparten varios motivos estructurales, incluyendo un dominio de dimerización N-terminal rico en prolina, un dominio de homología de Pleckstrin (PH), un dominio SH2, y un residuo de tirosina conservado cerca del extremo C-terminal (ref. 11) (Fig 1A). LNK se une constitutivamente a MPL vía su dominio SH2 y se co-localiza en la membrana plasmática vía su dominio PH. (refs. 12, 13). A la estimulación de citoquinas con TPO, LNK se une fuertemente a JAK2 y amortigua o termina la activación posterior de STAT. (ref. 12). *LNK*<sup>-/-</sup> ratones muestran características consistentes con un fenotipo MPN, incluyendo un compartimento expandido de células madre hematopoyéticas (HSC), hiperplasia megacariocítica, esplenomegalia, leucocitosis, y trombocitosis. (refs. 14-16). Este fenotipo es dependiente de TPO, mientras que *LNK*<sup>-/-</sup> ratones cruzado con *TPO*<sup>-/-</sup> ratones no muestra estas características. (ref. 17). Además, *LNK*<sup>-/-</sup> HSCs muestra activación potenciada de JAK2 en respuesta a la estimulación de TPO. (ref. 12). Estos resultados proporcionan resultados convincentes de que LNK juega un papel central en la regulación de la hematopoyesis, y que la abrogación de la actividad LNK puede ser una característica importante de MPNs patogénicas. Por lo tanto, hemos secuenciado *LNK* en un cohorte de MPNs negativas de *JAK2*-V617F, y ahora presentamos nuevas mutaciones de LNK que conducen a una señalización y crecimiento de JAK-STAT desregulada.

### Resultados

#### Identificación de las mutaciones somáticas de *LNK* en MPNs negativas de *JAK2* V617F

La secuenciación directa de la región de *LNK* que abarca los dominios PH y SH2 (parcial exón 2 a exón 7) (Fig 1A) se realizó en muestras de 33 pacientes con MPNs negativas de *JAK2* V617F (como se define por la Organización Mundial de la Salud) (Tabla 1), dando como resultado la identificación de dos nuevas mutaciones en el exón 2 de *LNK*. Como se muestra en la Fig 1B, una delección 5 pb y una mutación contra sentido (NM\_005475.2:c[603\_607]delGCGCT; 613C>G), en lo sucesivo denominado DEL), que conduce a un codón de parada prematuro se identificó en el paciente 01 con PMF. Esta mutación da como resultado la ausencia de ambos dominios PH y SH2 (Fig 1C y D).

En el paciente 02 con ET (historia del caso en la Fig 4), se identificó una mutación contra sentido (NM\_005475.2:c.622G>C) que conduce a un ácido glutámico en sustitución de glutamina (E208Q) que se localiza en el dominio PH. Ambos casos fueron negativos para las mutaciones *MPL* W515 (datos no mostrados). La secuenciación de DNA de la línea germinal a partir de cultivos de fibroblastos de piel de estos pacientes revelaron una secuencia de *LNK* de tipo nativo (Fig 1E), lo que confirma que estas mutaciones eran somáticas. Ninguna de estas mutaciones se han reportado en las bases de datos de SNP disponibles públicamente. En general, la frecuencia de mutaciones *LNK* identificadas en nuestra cohorte de pacientes MPN negativa de *JAK2* V617F fue 2/33 (6%).

Las mutaciones *LNK* causan crecimiento dependiente de TPO desregulado y activación de STAT3/5

Para investigar los efectos funcionales de las mutaciones *LNK* en patogénesis MPN, formas *LNK* de tipo nativo (WT) o mutante fueron expresadas retroviralmente en la línea celular BaF3-MPL dependiente de TPO. Las células BaF3-MPL mostraron un crecimiento dependiente de la dosis de TPO que se inhibió por la expresión de WT *LNK* (Fig 2A). De acuerdo con estudios previos (ref. 13), una mutación puntual sintética que desorganiza el dominio SH2 (R392E) abolió la inhibición mediada por *LNK* del crecimiento dependiente de TPO. Del mismo modo, el mutante DEL carecía de la habilidad para inhibir el crecimiento mediado por TPO, de acuerdo con una pérdida de la función de retroalimentación negativa de *LNK*. En contraste, el mutante E208Q retiene la actividad inhibitoria parcial, lo que sugiere que las mutaciones de *LNK* pueden conferir un espectro de fenotipos. Este efecto diferencial se destacó más adelante durante el análisis de la señalización JAK-STAT en muestras primarias de pacientes MPN que llevan estas mutaciones.

*LNK* inhibe la proliferación mediada por TPO por unión a MPL y JAK2 y bloqueo de la activación posterior de STAT3/5. (refs. 12, 13). Por lo tanto, hemos investigado los efectos de las mutaciones *LNK* en la activación mediada por TPO de la vía JAK2-STAT3/5. Las células BaF3-MPL que expresan WT y el *LNK* mutante se estimularon con TPO, y la fosforilación (activación) de JAK2, STAT3, y STAT5 se midió vía citometría de flujo fosfo específica (Fig 2B y Fig 4). En células BaF3-MPL transducidas con el vector vacío (EV), la estimulación con TPO (1 ng/ml) dio como resultado la activación robusta de la vía JAK2-STAT3/5, que alcanzó su pico máximo a aproximadamente 30 minutos y se mantuvo hasta los 60 minutos. En contraste, células que expresan WT *LNK* mostraron activación reducida de JAK2-STAT3/5, que alcanzó su pico máximo transitoriamente a aproximadamente a los 30 minutos y se redujo inmediatamente. Las células BaF3-MPL que expresan el mutante R392E del dominio SH2 perdieron la capacidad inhibitoria de *LNK* y lograron activación máxima y sostenida de JAK2-STAT3/5 de 30 a 120 minutos, dos veces más que EV. Las células que expresan el mutante DEL actuaron de manera similar a EV, mostrando activación sostenida de JAK2-STAT3/5 de 30 a 60 minutos. El mutante E208Q retuvo la capacidad inhibitoria casi completa en este sistema, lo que sugiere que puede conferir una sutil pérdida de la función, de acuerdo con la inhibición parcial vista en los ensayos de crecimiento. Estos resultados son consistentes con los estudios previos que muestran que *LNK* juega un papel importante en la terminación de la señalización JAK-STAT después de la estimulación de citoquinas (ref. 12), tal que la pérdida de mutaciones de función pueden permitir la activación sin interrupciones de JAK-STAT y el aumento de la proliferación celular normalmente observado en MPNs.

Con el fin de evaluar el papel de JAK2 en la inhibición mediada por *LNK* de la activación y proliferación de STAT3/5 dependiente de TPO, las células BaF3-MPL se cultivaron en presencia de un inhibidor de pan-JAK (inhibidor I de JAK). Las células BaF3-MPL que expresan WT o *LNK* mutante permanecieron susceptibles a la inhibición de JAK con IC50 similar para cada línea celular (Fig 2C). Igualmente, la activación de JAK2-STAT3/5 se inhibió efectivamente con el inhibidor I de JAK en todas las líneas celulares (Fig. 5). Estos resultados confirman que en presencia de WT o *LNK* mutante, el crecimiento y la activación de STAT mediado por TPO pueden ser abrogados por la inhibición de JAK.

Las mutaciones de *LNK* se asocian a la activación aberrante de JAK-STAT de las células CD34+ progenitoras tempranas del compartimento

Examinamos la señalización de JAK-STAT en células mieloides inmaduras circulantes (Fig. 6) de un donante normal así como en pacientes MPN que tienen mutaciones de *LNK*, *JAK2V617F*, o *MPLW515L*. Como se muestra en la Fig 3A (izquierda), la estimulación con TPO o G-CSF reveló una única subpoblación de STAT3/5 fosforilada (pSTAT3+/5+) que se incrementó notablemente en DEL comparado con muestras de donantes normales. Se observó una subpoblación de pSTAT3+/5+ similar sensible a citoquinas con muestras PMF *JAK2V617F* positivas y *MPLW515L* positivas, lo que sugiere que este puede ser un fenotipo común entre los pacientes PMF. Curiosamente, las células de un paciente que tienen la mutación E208Q mostraron fosforilación elevada de STAT3/5 en respuesta a TPO, pero no a G-CSF, lo que sugiere que una pérdida parcial de la función de *LNK* puede generar perfiles de activación diferentes de STAT sensibles a citoquinas específicas. La activación de STAT3/5 se midió también en presencia del inhibidor I de JAK (Fig 3A, derecha). En cada caso, la subpoblación pSTAT3+/5+ se erradicó completamente por la inhibición de JAK, confirmando que la activación de STAT3/5 era dependiente de la actividad de JAK.

Con el fin de caracterizar aún más la población pSTAT3+/5+ sensible a citoquinas ("sensible"), se realizó el análisis de marcadores de superficie extendida en este subgrupo. Como se muestra en la Fig 3B, las células sensibles del DEL eran predominantemente CD34+ (81% sensibles a TPO y 89% sensibles a G-CSF), lo que sugiere que las células sensibles consistían principalmente en progenitores tempranos y/o HSCs. Además, cuando se comparó poblaciones celulares sensibles a citoquinas frente a no sensibles, la expresión de CD34+ aumentó notablemente entre las células sensibles, lo que indica que la sensibilidad a citoquinas puede ser una característica distintiva del compartimento progenitor temprano. Se calculó la frecuencia total de las células CD34+ sensibles (Fig 3C), y se encontró que esta subpoblación aumentaba notablemente en DEL comparado con un donante normal. Resultados similares se encontraron para muestras PMF de *JAK2 V617F* positiva y *MPL W515L* positiva. En E208Q, sensible a TPO, pero no sensible a G-CSF, se incrementaron las células CD34+. Estos hallazgos sugieren que la activación de STAT3/5 mediada por TPO y/o G-CSF en el compartimento progenitor temprano de CD34+ es una característica recurrente en MPNs, pero que puede haber un espectro de fenotipos.

Dada la abundancia anormal de células CD34+ sensibles a citoquinas en DEL, investigamos si la mutación de LNK estaba presente en estas células. Como se muestra en la Fig 3D, el PCR cuantitativo específico de alelos confirmó la presencia de la mutación DEL en las células sensibles a citoquinas. Además, la ausencia de la mutación DEL en las células T sugiere que la mutación estaba restringida al tipo mielóide. Finalmente, la carga del alelo mutante fue ~50% en todas las células mieloides examinadas, consistente con una mutación heterocigótica. Estos hallazgos sugieren que las mutaciones de LNK surgen en el compartimento progenitor temprano de CD34+ y representan un evento genético temprano en patogénesis MPN.

#### Discusión

Nuestra identificación de mutaciones en el gen *LNK* en un subgrupo de pacientes MPN, la primera relacionada con cualquier enfermedad humana, demuestra que la interrupción de una proteína adaptadora inhibitoria puede fenocopiar una enfermedad típicamente impulsada por la activación de mutaciones en las tirosina quinasas (es decir *JAK2*, *MPL*). Detectamos mutaciones en 2/33 (6%) pacientes MPN con *JAK2* V617F negativa. Esta frecuencia es similar a la ocurrencia de mutaciones *MPL* W515 en ET y PMF, pero sería necesario el cribado de una cohorte mayor para determinar la frecuencia verdadera de las mutaciones de *LNK* y su relevancia en las características clinicopatológicas y pronóstico de MPN. Dado que los estudios previos *in Vitro* han demostrado que *LNK* puede inhibir la actividad de ambos *MPL* W515L y *JAK2* V617F (refs. 13, 18), es concebible que la pérdida de función de *LNK* puede ocurrir así como un evento de cooperación en la patogénesis de estos MPNs.

Ambas mutaciones de *LNK* descritas aquí afectan al dominio PH, y las mutaciones en los dominios PH de otras proteínas (p.ej., *AKT1*) se han reportado en tumores sólidos (refs. 19, 20), lo que sugiere que este puede ser un mecanismo cada vez más reconocido de tumorigénesis. Dado que el dominio PH de *LNK* es importante para la localización en la membrana plasmática, las mutaciones DEL y E208Q podían dar como resultado la deslocalización de *LNK* y la capacidad alterada para unirse a *MPL* y *JAK2* e inhibir la activación posterior de *STAT*. De hecho, un mutante de *LNK* sintético en el que se eliminó el dominio PH ya no podía localizarse en la membrana plasmática (ref. 13). El mutante DEL también carece del dominio SH2, lo que podía explicar su pérdida de función más completa. Esto está apoyado por estudios previos en los que una mutación puntual sintética que afecta al dominio PH dio como resultado una pérdida parcial de la función de *LNK* (similar a E208Q), mientras que las mutaciones que afectan al dominio SH2 eliminaron la unión a *MPL* y *JAK2* y dio como resultado un fenotipo más grave. (refs. 12, 13, 16, 21).

Nuestros resultados del PCR cuantitativo específico de alelo sugirieron que la mutación DEL es heterocigótica, apelando la noción de que la pérdida de un alelo *LNK* funcional (es decir, haploinsuficiencia) puede ser suficiente para iniciar la patogénesis MPN en estos casos. En estudios murinos, la ausencia de función de *LNK* (*LNK*<sup>-/-</sup>) conduce a un fenotipo MPN, mientras que la heterocigosidad (*LNK*<sup>+/-</sup>) confiere un fenotipo intermedio, consistente con el modelo de haploinsuficiencia (ref. 15). Por otra parte, como el dominio de dimerización N-terminal rico en prolina se mantiene con ambas mutaciones DEL y E208Q, la deslocalización del mutante de *LNK* podría conducir al aislamiento de WT *LNK*, conduciendo de este modo a la pérdida funcional de ambos alelos *LNK* (es decir trans dominancia). Esta hipótesis está soportada por un estudio previo en el que un mutante sintético que interrumpe ambos dominios PH y SH2 ejerce un efecto negativo dominante. (ref. 22).

*LNK* es un componente crítico de un bucle de retroalimentación negativa, de tal manera que la estimulación de citoquina con TPO induce al *LNK* para unirse fuertemente a *JAK2* y amortiguar o terminar la activación posterior de *STAT* (ref. 12). Esta regulación negativa es parte integral de la hematopoyesis normal y modulación del crecimiento y desarrollo de HSC. Nuestros hallazgos indican que la mutación de *LNK* interrumpe este eje de retroalimentación, permitiendo de este modo la activación potenciada y sostenida de *STAT3/5* en respuesta a la estimulación de citoquina y causando un aumento en la proliferación, como se demostró por los ensayos de crecimiento de BaF3-MPL. Estos efectos se manifestaron fisiológicamente como una sobreabundancia de progenitores tempranos de CD34+ sensibles a citoquina en pacientes MPN que tienen mutaciones *LNK*. Además, la presencia de la mutación DEL en el compartimento CD34+ sugiere que la interrupción de *LNK* confiere una ventaja de crecimiento a estas células y puede ser un evento genético temprano en patogénesis MPN, similar a hallazgos previos con *JAK2* V617F en PV. (ref. 23). El pSTAT3+/5+ sensible en muestras primarias de pacientes que tienen mutaciones *LNK* se encontró también en pacientes PMF que tienen mutaciones *JAK2* V617F o *MPL* W515L. Claramente, la activación JAK-STAT es una característica principal de la biología de MPN; en ausencia de las mutaciones *JAK2* o *MPL*, las mutaciones de *LNK* pueden conducir a esta respuesta aberrante. Además, la respuesta pSTAT3+/5+ anormal es una reminiscencia de las subpoblaciones observadas en leucemia mielógena aguda (ref. 24), lo que sugiere que este fenotipo de señalización es una característica recurrente encontrada en un espectro de neoplasias mieloides. Desde la señalización y el crecimiento de líneas celulares y muestras primarias que tienen mutaciones de *LNK* mediadas por TPO se inhibieron eficazmente por un inhibidor de *JAK*, el tratamiento con inhibidores *JAK2* puede ser factible para pacientes con mutaciones *LNK*. De hecho, en los ensayos en fase temprana con inhibidores *JAK2*, las respuestas se han observado en ambos pacientes MPN con *JAK2* V617F positivo y negativo (ref. 25), y será por tanto de interés para cribar estas a últimas personas por las mutaciones *LNK*.

**Métodos**

Muestras clínicas

5 Todas las muestras clínicas se obtuvieron con consentimiento informado y con la aprobación de Institutional Review Board of Stanford University School of Medicine. Muestras de sangre periférica se obtuvieron en heparina de sodio y se estimularon inmediatamente con citoquinas, o después del aislamiento de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) con separación por gradiente de densidad de Ficoll de acuerdo con procedimientos estándar. (refs. 24, 26). Fibroblastos de piel se aislaron por disgregación mecánica de biopsias por punción de la piel y se establecieron en un cultivo en monocapa de corto plazo usando métodos estándares.

Secuenciación

10 DNA genómico (gDNA) se extrajo de muestras de sangre periférica o cultivos de fibroblastos de piel usando o el Kit QIAamp DNA Blood Mini o el Kit Gentra Purgene Blood (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad y la cantidad del gDNA se evaluó usando un Espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE), PCR y las secuenciaciones de los cebadores para los exones de *LNK* de 2 a 7, que cubren los dominios PH y SH2, se diseñaron de la siguiente manera:

- 15 (SEQ ID NO: 1) LNK\_PART\_EX2\_F: CGGAGAGGTGCTGAGAC
- (SEQ ID NO: 2) LNK\_PART\_EX2\_R: TTGCACTCGGCCTAAAAGTT
- (SEQ ID NO: 3) LNK\_PART\_EX2\_F\_nido: AAGAAGTTCCTGCCCTGGAG
- (SEQ ID NO: 4) LNK\_PART\_EX2\_R\_nido: CTGGAAAGCCATCACACCTC
- (SEQ ID NO: 5) LNK EX 3-5\_F: AACTCAGGCCTGGCTGG
- 20 (SEQ ID NO: 6) LNK EX 3-5\_R: GGGCTACCTTATGTCCTGGG
- (SEQ ID NO: 7) LNK EX 3-5\_F\_INTSEQ: GGTGGGAGACGAGCAG
- (SEQ ID NO: 8) LNK EX 3-5\_R\_INTSEQ: CTGTGCACTCCGAGAGC
- (SEQ ID NO: 9) LNK EX 6-7\_F: GTACGCTGGAACCCAGACTC
- (SEQ ID NO: 10) LNK EX 6-7\_R: GTCTGCAGCAAGCCTCTACC
- 25 (SEQ ID NO: 11) LNK EX 6-7\_nido\_F: ACTCAGCCCAGGACATAAGG
- (SEQ ID NO: 12) LNK EX 6-7\_nido\_R: GCCTCTACCCTCTACCCAGTG
- (SEQ ID NO: 13) LNK EX 6\_NEST\_SEQF: GCTCATGGAGTGTTCTGGT
- (SEQ ID NO: 14) LNK EX 6\_NEST\_SEQR: AGGTGCTGTGGGAGGAGAG

30 La PCR Touchdown se realizó de acuerdo con los protocolos estándar, seguido por electroforesis en gel de agarosa para comprobar la amplificación adecuada antes del análisis de la secuencia. La secuenciación bi-direccional se realizó usando un BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y Applied Biosystems 3100 o 3730xl DNA Analyzer, de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Cultivos celulares

35 Las células BaF3-MPL fueron generosamente proporcionadas por J. Tyner/B. Druker (Oregon Health and Sciences University, Portland, OR) y se mantuvieron en un medio RPMI que contiene un 10% de FBS y IL-3 (1 ng/ml) (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Para los ensayos de crecimiento, las células BaF3-MPL se lavaron dos veces con medio libre de citoquina y se re-platearon en RPMI con un 10% de FBS y TPO (0-10 ng/ml) (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Para los ensayos de crecimiento del inhibidor de JAK, las células BaF3-MPL se cultivaron con TPO (10 ng/ml) en presencia de control de DMSO o inhibidor de JAK (EMD/Calbiochem, San Diego, CA) a varias concentraciones. Se

40 contaron las células viables diariamente por tinción con yoduro de propidio (PI) y se cuantificó con cuentas TruCount (BD Biosciences, San Jose, CA) en un citómetro de flujo LSRII. Las células de empaquetamiento retroviral Phoenix-Eco se mantuvieron en un medio DMEM que contiene un 10% de FBS.

Vectores de expresión

Las secuencias de LNK de tipo nativo y DEL se sintetizaron por DNA 2.0 (Menlo Park, CA) en un vector donante compatible con Gateway. El vector de expresión retroviral pSR $\alpha$  fue amablemente proporcionado por J. Tyner/B. Druker y se convirtió en un vector de destino compatible con Gateway (pSR $\alpha$ -GW) usando el Gateway Vector Conversion System (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias WT y DEL se transfirieron a pSR $\alpha$ -GW usando una clonasa LR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los mutantes E208Q y R392E se generaron a partir de WT LNK usando QuikChange Lightning Kit (Stratagene, La Jolla, CA) y se verificaron por secuenciación directa.

Transducción retroviral

Los vectores de expresión retroviral se transfectaron en células Phoenix-Eco usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los sobrenadantes retrovirales se recogieron dos días después de la trasfección, se añadieron a las células BaF3-MPL con polibreno (4 mg/ml) en placas recubiertas de retronectina, y se centrifugaron a 1.500 x g durante 90 minutos. Dos días después de la transducción, las células se seleccionaron en G418 (750 ng/ml) durante al menos una semana, hasta que las células transducidas fueran creciendo de una manera estable.

Estimulación de citoquina y citometría de flujo fosfo específica

Las células BaF3-MPL se murieron de inanición durante la noche en un medio libre de citoquina y estimulado con TPO (1 o 10 ng/ml) para los puntos de tiempo que oscilan entre 15 minutos y 16 horas a 37°C. Las muestras de sangre periférica se estimularon o con TPO (50 ng/ml) o con G-CSF (20 ng/ml) (Peprotech, Rocky Hill, NJ) durante 15 minutos a 37°C. PBMCs se apoyaron en RPMI con un 10% de FBS durante una hora a 37°C antes de la estimulación con citoquina. Para los experimentos del inhibidor de JAK, PBMCs se incubaron con inhibidor I de JAK 5  $\mu$ M (EMD/Calbiochem, San Diego, CA) durante los últimos 30 minutos antes de la estimulación con citoquina. Después de la estimulación con citoquina, las células se fijaron en paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Para muestras de sangre periférica, las células rojas de la sangre fueron lisadas en condiciones hipotónicas. Las células fijadas se permeabilizaron después en metanol enfriado con hielo y se tiñeron para los marcadores de superficie celular y/o epitopos intracelulares fosfo específicos de acuerdo con los procedimientos estándar. (refs. 24, 26). Se usaron los siguientes anticuerpos (a menos que se indique lo contrario, todos los anticuerpos se obtuvieron de BD Biosciences, San Jose, CA): pSTAT3 (pY705, clon 4/P), pSTAT5 (pY694, clon 47), pJAK2 (pY1007/1008), Cell Signaling Technology, Danvers, MA), CD34 (clon 8G12), CD38 (clon HIT2, Invitrogen, Carlsbad, CA), CD14 (clon M5E2), CD66 (clon B1.1), CD33 (clon P67.6), CD3 (clon UCHT1, Beckman Coulter, Brea, CA). Las células se midieron en un citómetro de flujo BD LSR II. Para clasificar los experimentos, las células se ordenaron directamente en PBS usando un clasificador de células BD FACSAria II. Los datos de citometría de flujo se obtuvieron con un software FACSDiva y se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) o Cytobank de acuerdo con los procedimientos estándar. (refs. 24, 26)

PCR cuantitativo específico de alelos

El DNA de las células clasificadas se extrajo usando RecoverALL (Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones se realizaron en un Rotor-Gene 3000 (Corbett/Qiagen, Valencia, CA) usando Power SYBR Green PXR Master Mix (Applied Biosystems) con tres réplicas en presencia de un 5% de DMSO. Los cebadores que hibridan a ambos alelos de LNK sin discriminación [(SEQ ID NO: 15) GCTGAAGGAGGCGGTGCT Y (SEQ ID NO: 16) GCTGTCCATGGAGGCCTCGT] y los cebadores específicos para el alelo del mutante (DEL) [(SEQ ID NO: 17) GGAGGCGGTGCTATAGCGT y (SEQ ID NO: 16) GCTGTCCATGGAGGCCTCGT] se usaron para amplificar o el LNK total o mutante. Las curvas de calibración separadas se construyeron usando diluciones en serie de plásmidos de DNA LNK WT o mutantes. La presencia relativa del alelo de LNK mutante se estimó como la relación de la concentración absoluta de mutante frente al LNK total dentro de los subgrupos celulares analizados.

Tabla 1. Diagnósticos del paciente

Diagnóstico	# de pacientes
ET	14
PMF	18
MDS/MPN con fibrósis <sup>†</sup>	1

ET: trombocitemia esencial; PMF: mielofibrosis primaria;

MDS/MPN: síndrome mielodisplástico/neoplasia mieloproliferativa

<sup>†</sup>La sangre periférica mostró leucopenia con neutrófilos displásicos y trombocitosis;

La médula ósea era hiper celular con agrupación de megacariocitos con hiperplasia mieloide y fibrosis severa (+4)

Informes de casos clínicos de dos pacientes con mutaciones de *LNK*

El paciente 01 es un hombre de 75 años que se presentó en 2007 con fatiga. El examen físico fue notable por esplenomegalia superior a 20 centímetros por debajo del margen costal. El recuento de glóbulos blancos fue 12.100/mm<sup>3</sup>, hemoglobina 6,3 g/dL, y el recuento de plaquetas de 323.000/mm<sup>3</sup>. El frotis de la sangre periférica mostró leucoeritroblastosis incluyendo lágrima y formas de glóbulos rojos nucleados, y células mieloides inmaduras. Un aspirado de la médula ósea fue aspillado y no se realizó el análisis citogenético. La biopsia de la médula ósea reveló fibrosis marcada y difusa con hiperplasia y cúmulo de megacariocitos. La citometría de flujo mostró un 6% de blastos en la sangre periférica y un 8% en la médula. El análisis de la mutación *JAK2* V617F fue negativo. Se hizo un diagnóstico de la mielofibrosis primaria. El paciente ha dependido de una transfusión de glóbulos rojos y no responde a varias terapias incluyendo prednisona, danazol, eritropoyetina, e hidroxiurea. En la actualidad se le ha considerado para un ensayo clínico de inhibidor de *JAK2*.

El paciente 02 es un hombre de 59 años que se presentó en 2002 con un recuento de plaquetas de 1,2 millones/mm<sup>3</sup> y por lo demás recuentos sanguíneos normales. No se presentó organomegalia en el examen. Se excluyeron las causas reactivas de la trombocitosis. El frotis de sangre periférica mostró formas de plaquetas gigantes sin otras anomalías morfológicas significantes y la biopsia de la médula ósea fue normocelular con un aumento de los megacariocitos, consistente con la trombocitemia esencial.

Las citogenéticas fueron normales y el análisis de la mutación *JAK2* V617F fue negativo. Se le ha tratado con aspirina y uso intermitente de agentes citoreductivos incluyendo anagrelide e hidroxiurea, sin ninguna complicación trombohemorrágica.

Estudios adicionales

Examen de la localización intracelular de mutantes de *LNK*: Estudios previos han mostrado que *LNK* se localiza en la membrana plasmática vía el dominio PH, donde interacciona directamente con MPL y *JAK2* (Bersenev y colaboradores, J. Clin. Invest 2008, 118:2832-2844; y Gery y colaboradores, Blood 2007, 110:3360-3364). El mutante R392E de *LNK* SH2 y un mutante de delección que carece del dominio SH2 retienen ambos la capacidad de localizarse en la membrana plasmática. Sin embargo un mutante de delección que carece de ambos dominios SH2 y PH (del PH/SH2) pierde esta capacidad (Gery y colaboradores, Blood 2007, 110:3360-3364). Este mutante, que retiene el extremo N-terminal de *LNK* (incluyendo el dominio de dimerización), seguido por un codón de parada prematuro justo antes del dominio PH, es sorprendentemente similar al mutante *LNK* DEL que hemos identificado (Fig 7). Por lo tanto, predecimos que el mutante *LNK* DEL ya no se localizará tampoco en la membrana plasmática. Para probar esta hipótesis, realizaremos experimentos de inmunofluorescencia en los que las células que expresan *LNK* de tipo nativo y los mutantes *LNK* DEL y E208Q se teñirán con anticuerpos específicos de *LNK* y se examinarán con microscopía confocal. Están disponibles anticuerpos específicos comercialmente disponibles, pero planeamos introducir una etiqueta de epítipo (p.ej., etiqueta HA) en el extremo N-terminal de *LNK* para facilitar estos experimentos.

Evaluación de mutantes de *LNK* como dominantes negativos potenciales: Los mutantes *LNK* DEL y E208Q que se acaban de describir pueden carecer de alguna o todas las funciones del *LNK* de tipo nativo. Además, cuando se expresan en presencia de una proteína de *LNK* de tipo nativo (como en el estado heterocigótico como se describió para pacientes que tienen estas mutaciones), pueden actuar como dominantes negativos. Esto es particularmente cierto para el mutante *LNK* DEL, que probablemente pierde la capacidad de localizarse en la membrana plasmática debido a la ausencia del dominio PH. Sin embargo, como este mutante retiene el dominio de dimerización, especulamos que pueda dimerizarse con el *LNK* de tipo nativo y causar también la localización errónea de la proteína de tipo nativo. Este concepto se soporta además por estudios previos en los que se ha mostrado que un mutante con estructura similar (que contiene un delección del dominio PH y una mutación puntual que interrumpe el dominio SH2) (Fig 7) tiene la capacidad de ejercer un efecto dominante negativo (Takizawa y colaboradores, Blood 2006, 107:2968-2975).

Referencias

1. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, y colaboradores. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005; 365: 1054-61.
2. James C, Ugo V, Le Couedic JP, y colaboradores A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005; 434: 1144-8.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, y colaboradores. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005; 352: 1779-90.

4. Levine R, Wadleigh M, Cools J, y colaboradores. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, Essentials thrombocythemia, and mieloide metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-97.
- 5 5. Scott LM, Tong W, Levine R, y colaboradores. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 459-68.
6. Pilkman Y, Lee BH, Mercher T, y colaboradores. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3: e270.
7. Pardanani A, Levine R, Lasho T, y colaboradores. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108: 3472-6.
- 10 8. Teofili L, Martini M, Cenci T, y colaboradores. Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK2 mutation. *Blood* 2007; 110: 354-9.
- 15 9. Heller P, Lev P, Salim J, y colaboradores. JAK2V617F mutation in platelets from essentials thrombocythemia patients: correlation with clinical features and analysis of STAT5 phosphorylation status. *Eur J Haematol* 2006; 77: 210-6.
10. Mesa R, Tefferi A, Lasho T, y colaboradores. Janus Kinase 2 (V617F) mutation status, signal trasducer and activator of transcription-3 phosphorylation and impaired neutrophil apoptosis in myelofirosis with myeloid metaplasia. *Leukemia* 2006; 20: 1800-8.
11. Rudd CE. Lnk adaptor: novel negative regulator of B cell lymphopoiesis. *Sci. STKE* 2001; 2001: PE1.
- 20 12. Bersenev A, Wu C, Balcerek J, Tong W. Lnk controls mouse hematopoietic stem cell selfrenewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J Clin Invest* 2008.
13. Gery S, Gueller S, Chumakova K, Kawamata N, Liu L, Koeffler HP. Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative disorders. *Blood* 2007; 110: 3360-4.
- 25 14. Takaki S, Morita H, Tezuka Y, Takatsu K. Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med* 2002; 195: 151-60.
15. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, y colaboradores. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med* 2002; 195: 1599-611.
16. Tong W, Lodish HF, Lnk inhibits Tpo-mpl signalling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med* 2004; 200: 569-80.
- 30 17. Buza-Vidas N, Antonchuk J, Qian H, y colaboradores. Citokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes Dev* 2006; 20: 2018-23.
18. Gery S, Cao Q, Gueller S, Xing H, Tefferi A, Koeffler HP. Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 957-65.
- 35 19. Carpten JD, Faber AL, Horn C, y colaboradores. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007; 448: 439-44.
20. Shoji K, Oda K, Nakagawa S, y colaboradores. The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. *Br J Cancer* 2009; 101:145-8.
21. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* 2005; 105: 4604-12.
- 40 22. Takizawa H, Kubo-Akashi C, Nobuhisa I, y colaboradores. Enhanced engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells by the transient inhibition of an adaptor protein, Lnk. *Blood* 2006; 107: 2968-75.
23. Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, y colaboradores. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6224-9.
- 45 24. Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, y colaboradores. Single cell profiling of potentiated phosphor-protein networks in cancer cells. *Cell* 2004; 118: 217-28.

25. Verstovsek S, Kantarjian HM, Pardanani AD, y colaboradores. The JAK inhibitor, INCB018424, demonstrates durable and marked clinical responses in primary myelofibrosis (PMF) and postpolycythemia/essential thrombocythemia myelofibrosis (post PV/ETMF). ASH Annual Meeting Abstracts 2008; 112: 1762.

5 26. Kotecha N, Flores N, Irish J, y colaboradores. Single-cell profiling identifies aberrant STAT5 activation in myeloid malignancies with specific clinical and biologic correlates. Cancer Cell 2008; 14: 335-43.

10 Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de entendimiento, es fácilmente evidente para aquellos expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que ciertos cambios y modificaciones se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15 En consecuencia, lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que aquellos expertos en la técnica podrán concebir varias disposiciones que, aunque no se describan o muestren explícitamente aquí, encarnan los principios de la invención y se incluyen dentro de su espíritu y alcance. Además, todos los ejemplos y lenguaje condicional mencionados aquí tienen como objetivo principal ayudar al lector a entender los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para el avance de la técnica, y se deben interpretar como sin limitación a tales ejemplos y condiciones específicamente mencionadas. Además, todas las declaraciones mencionadas aquí, aspectos, y realizaciones de la invención así como ejemplos específicos de los mismos, pretenden incluir ambos equivalentes estructurales y funcionales de los mismos. Además, se pretende que tales equivalentes incluyan tanto los equivalentes conocidos en la actualidad como equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por tanto, no pretende limitarse a las realizaciones ejemplares mostradas y descritas aquí. Más bien, el alcance y el espíritu de la presente invención se materializan en las reivindicaciones adjuntas.

20

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Gotlib, Jason Robert  
 NOLAN, GARRY P.  
 Zehnder, James L.  
 Oh, Stephen Tracy
- <120> Mutaciones en el gen LNK en pacientes con neoplasia mieloproliferativa y otras neoplasias malignas hematolinfoides
- 10 <130> STAN-730WO
- <150> 61/295,117  
 <151> 14-01-2010
- 15 <160> 27
- <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
- 20 <210> 1  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético
- <400> 1  
 cggagaggct gctgagac 18
- 30 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético
- <400> 2  
 tgcactcgg cctaaaagtt 20
- 40 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético
- <400> 3  
 aagaagttcc tgcctggag 20
- 50 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético
- 60 <400> 4  
 ctggaaagcc atcacacctc 20
- <210> 5  
 <211> 17

<212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 5  
 aactcaggcc tggctgg 17  
  
 10 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 6  
 gggctacctt atgtcctggg 20  
 20  
 <210> 7  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 7  
 30 ggtgggagac gagcag 16  
  
 <210> 8  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 8  
 40 ctgtgcactc cgagagc 17  
  
 <210> 9  
 <211> 20  
 45 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 50  
 <400> 9  
 gtacgctgga acccagactc 20  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 60 <223> oligonucleótido sintético  
  
 <400> 10  
 gtctgcagca agcctctacc 20  
 65 <210> 11

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 11  
 actcagccca ggacataagg 20  
 10 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 12  
 20 gcctctaccc tctaccagct g 21  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 13  
 30 gctcatggag tgttcctggt 20  
 <210> 14  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 14  
 40 aggtgctgtg ggaggagag 19  
 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 15  
 gctgaaggag gcggtgct 18  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 16  
 65 gctgtccatg gaggcctcgt 20

ES 2 618 310 T3

<210> 17  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 17  
 ggaggcgggtg ctatagcgt 19  
 10  
 <210> 18  
 <211> 200  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 18  
 ctgcgctaca gcctggccga cgaggcctcc atggacagcg gggcacgctg gcagcgcggg 60  
 aggctggcgc tgcgccgggc cccgggcccc gatggccccg accgcgtgct ggagctcttc 120  
 gaccaccca agagttcaag gcccaagcta caagcagctt gctccagcat ccaggaggtc 180  
 20 cggtggtgca cacggcttga 200  
 <210> 19  
 <211> 195  
 <212> DNA  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 30 <400> 19  
 ctacagcgtg gccgacgagg cctccatgga cagcggggca cgctggcagc gcgggaggct 60  
 ggcgctgcgc cgggccccgg gccccgatgg ccccgaccgc tgctggagc tcttcgacc 120  
 acccaagagt tcaaggcca agctacaagc agcttgctcc agcatccagg aggtccggtg 180  
 35 gtgcacacgg cttga 195  
 <210> 20  
 <211> 200  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 20  
 ctgcgctaca gcctggccga ccaggcctcc atggacagcg gggcacgctg gcagcgcggg 60  
 aggctggcgc tgcgccgggc cccgggcccc gatggccccg accgcgtgct ggagctcttc 120  
 gaccaccca agagttcaag gcccaagcta caagcagctt gctccagcat ccaggaggtc 180  
 45 cggtggtgca cacggcttga 200  
 <210> 21  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 21

ES 2 618 310 T3

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

<210> 22  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

10 <400> 22  
 Ala Ala Pro Gly Thr Pro Gly Glu Ala Ala Glu Thr Pro Ala Arg Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ala Lys Lys Phe Leu Pro Trp Ser Leu Ala Arg Glu Pro Pro  
 20 25 30  
 Pro Glu Ala Leu Lys Glu Ala Val Leu Gln Arg Gly Arg Arg Gly Leu  
 35 40 45  
 His Gly Gln Arg Gly Thr Leu Ala Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ala Pro  
 50 55 60  
 Gly Pro Gly Pro Arg Trp Pro Arg Pro Arg Ala Gly Ala Leu Arg Pro  
 65 70 75 80  
 Thr Gln Glu Phe Lys Ala Gln Ala Thr Ser Ser Leu Leu Gln His Pro  
 85 90 95  
 Gly Gly Pro Val Val His Thr Ala  
 100

15 <210> 23  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

20 <400> 23

ES 2 618 310 T3

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

- 5 <210> 24  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético
- 15 <400> 24  
 ggtgctacag cgtggcc 17
- 20 <210> 25  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético
- 30 <400> 25  
 ggtgctgcbc tacagcctgg cc 22
- 35 <210> 26  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético
- 45 <400> 26  
 tggccgagga ggcctcc 17
- 50 <210> 27  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético
- 60 <400> 27  
 tggccgacga ggcctcc 17

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de cribado genético para determinar la presencia de o un predisposición a una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide que comprende:
 

5 determinar la secuencia de un gen LNK derivado de una muestra del sujeto, donde la muestra del sujeto comprende células sanguíneas; y

clasificar al sujeto que tiene o está predispuesto a una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide si la secuencia de LNK determinada tiene al menos una mutación, donde la mutación de LNK está dentro de los dominios de homología de Pleckstrin (PH) y/o homología 2 Src (SH2) y/o da como resultado una delección de todo o parte de los dominios de homología de Pleckstrin (PH) y/o SH2.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde la mutación de LNK da como resultado un aumento en la señalización de citoquinas en una célula en comparación con LNK de tipo nativo.
3. El método de la reivindicación 1, donde la mutación de LNK se selecciona de: E208Q y 603\_607delGCGCT; 613C>G.
4. El método de la reivindicación 1, donde la muestra es una muestra de sangre.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, donde la neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide es una neoplasia mieloproliferativa *JAK2* V617F negativa (MPN).
6. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de clasificación comprende comparar la secuencia de LNK determinada con una o más secuencias de LNK de referencia, donde las una o más secuencias de LNK de referencia incluyen una o ambas de:
 

20 una secuencia de LNK de un sujeto que se sabe que está predispuesto a una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide; y

una secuencia de LNK de un sujeto que se sabe que no está predispuesto a una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de determinación comprende una o más de las siguientes: PCR, hibridación de ácido nucleico, análisis de las secuencias, y ensayo de unión al anticuerpo.
8. Un método de identificación de un agente terapéutico candidato para uso en un medicamento para tratar una neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide en un sujeto, cuyo método comprende:
 

30 poner en contacto una célula que comprende una proteína LNK que tiene una mutación dentro de los dominios de homología de Pleckstrin (PH) y/o homología 2 Src (SH2), y/o una mutación que da como resultado una delección de todo o parte de los dominios PH y/o SH2 con un agente; e

identificar el agente como un agente terapéutico candidato para el tratamiento de neoplasia o neoplasia maligna hematolinfoide en un sujeto si el agente reduce la señalización de citoquinas en las células en comparación con un control.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, donde la mutación de LKN es una mutación como se describe en la reivindicación 3.
10. El método de la reivindicación 8 o reivindicación 9, donde la etapa de contacto además comprende poner en contacto la célula con citoquinas.
11. El método de la reivindicación 10, donde la citoquina es TPO.



**FIG. 1B**

cDNA

WT      CTGGCTACAGCCTGGCCGACGAGCCCTCCATGGACAGCGGGGACCGCTGGCAGCGCGGGAGGCTGGCCGCTGGCCCGGGCCCGGCCCCGATGGCCCCG  
 DEL      CTACAGCCTGGCCGACGAGCCCTCCATGGACAGCGGGGACCGCTGGCAGCGCGGGAGGCTGGCCGCTGGCCCGGGCCCGGCCCCGATGGCCCCG  
 622G>C(E208Q)      CTGGCTACAGCCTGGCCGACGAGCCCTCCATGGACAGCGGGGACCGCTGGCAGCGCGGGGAGGCTGGCCGCTGGCCCGGGCCCGGCCCCGATGGCCCCG

WT      710 720 730 740 750 760 770 780 790 800  
 ACCCGTGTGGAGCTTCGACCCACCCAGAGTTCAGGCCCAAGCTACAGCAGCTTGTCCAGCATCCAGAGGTCGGTGGTCACACAGCGCTTGA  
 DEL      ACCCGTGTGGAGCTTCGACCCACCCAGAGTTCAGGCCCAAGCTACAGCAGCTTGTCCAGCATCCAGAGGTCGGTGGTCACACAGCGCTTGA  
 622G>C(E208Q)      ACCCGTGTGGAGCTTCGACCCACCCAGAGTTCAGGCCCAAGCTACAGCAGCTTGTCCAGCATCCAGAGGTCGGTGGTCACACAGCGCTTGA

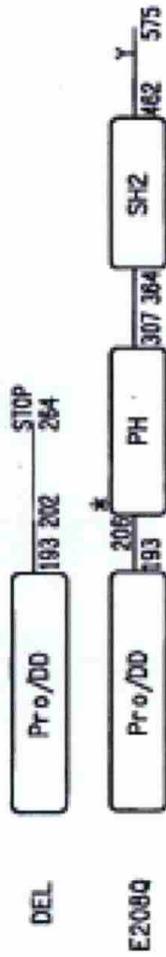
Codón de parada prematuro DEL

**FIG. 1C**

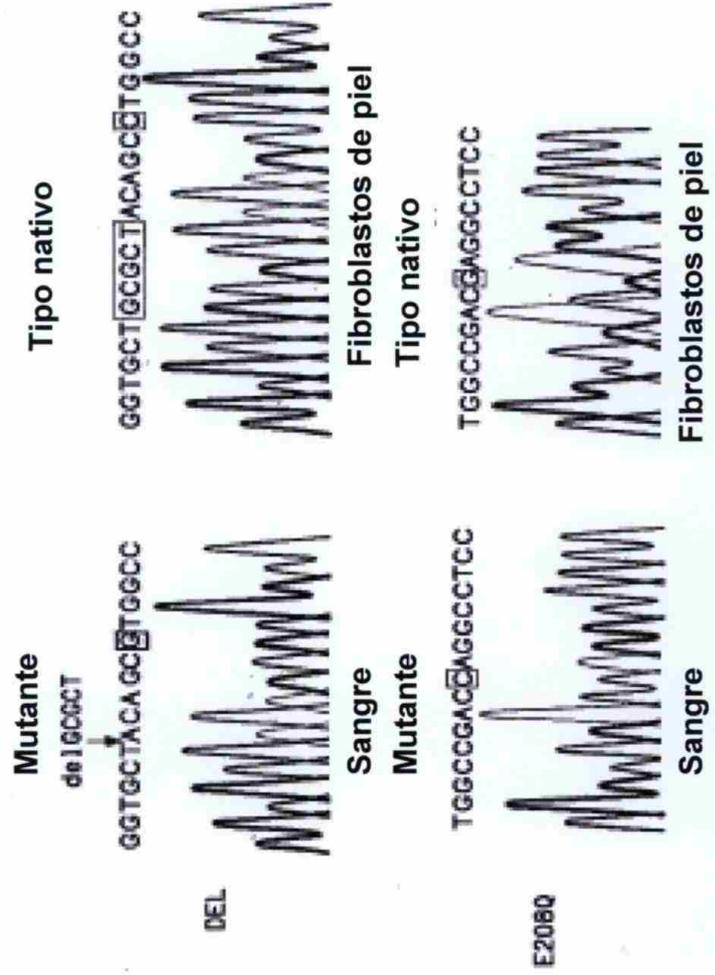
Proteína

WT      ..... Dominio PH .....  
 170 180 190 200 210 220 230 240  
 AAPGTPGEAMETPARPGLAKKFLPWSLAREPPPEALKEAVLRYSLADEASMSDGGARWQRGLALRRAPGPDGPDRLVLELF  
 DEL      AAPGTPGEAMETPARPGLAKKFLPWSLAREPPPEALKEAVLRYSLADEASMSDGGARWQRGLALRRAPGPDGPDRLVLELF  
 622G>C(E208Q)      AAPGTPGEAMETPARPGLAKKFLPWSLAREPPPEALKEAVLRYSLADEASMSDGGARWQRGLALRRAPGPDGPDRLVLELF

WT      .....  
 250 260 270 280 290 300 310 320  
 DPPKSSRPKLAQACSSIQEVRNICTRLEMPDNLTYFVLKVKDRTDIIFEVGDEQQLNSHMAELSECTGRGLESTEAEWHIP  
 DEL      IQEYKAGATSSLLQHPGGPVVHTA  
 622G>C(E208Q)      DPPKSSRPKLAQACSSIQEVRNICTRLEMPDNLTYFVLKVKDRTDIIFEVGDEQQLNSHMAELSECTGRGLESTEAEWHIP



**FIG. 1D**



**FIG. 1E**

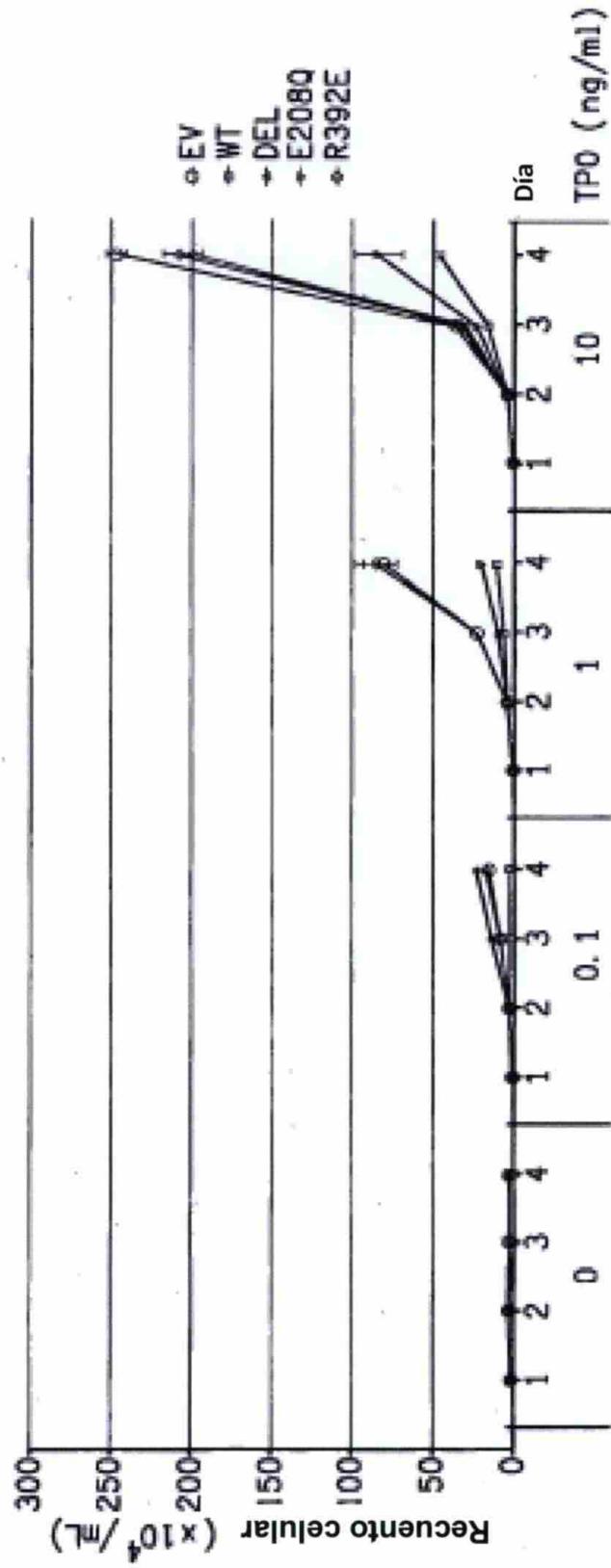
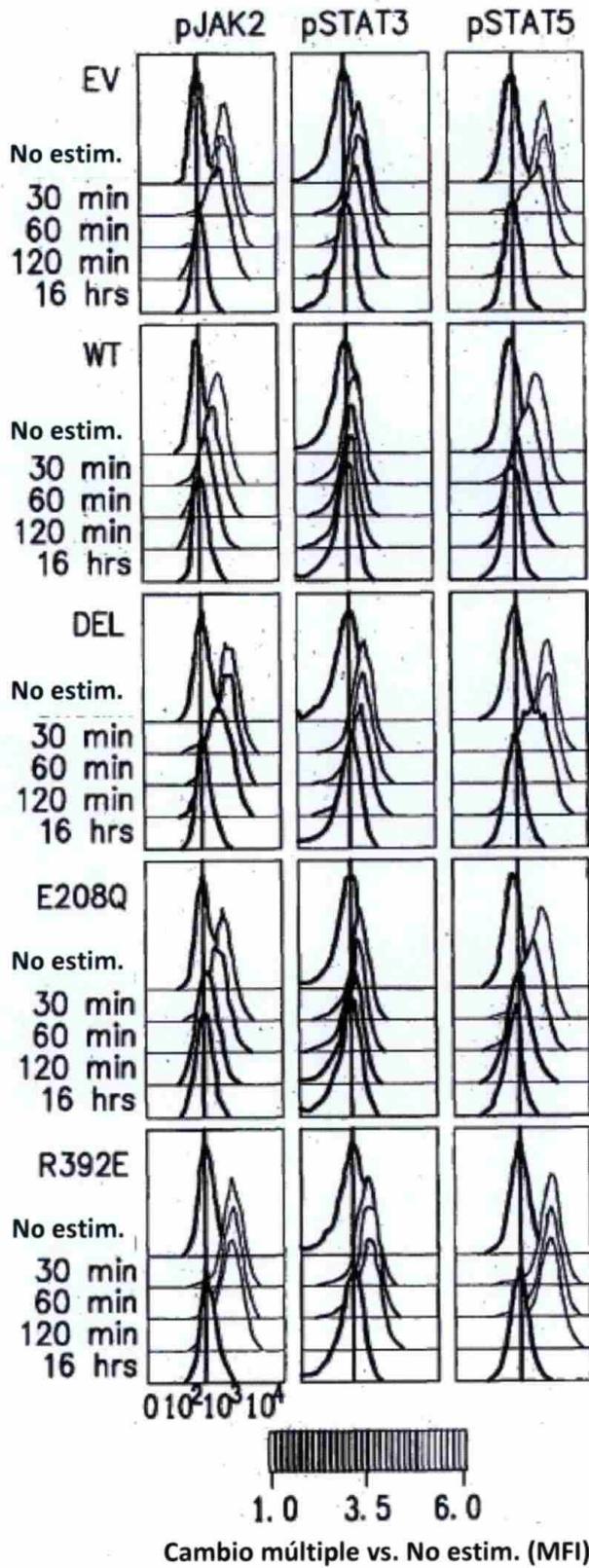
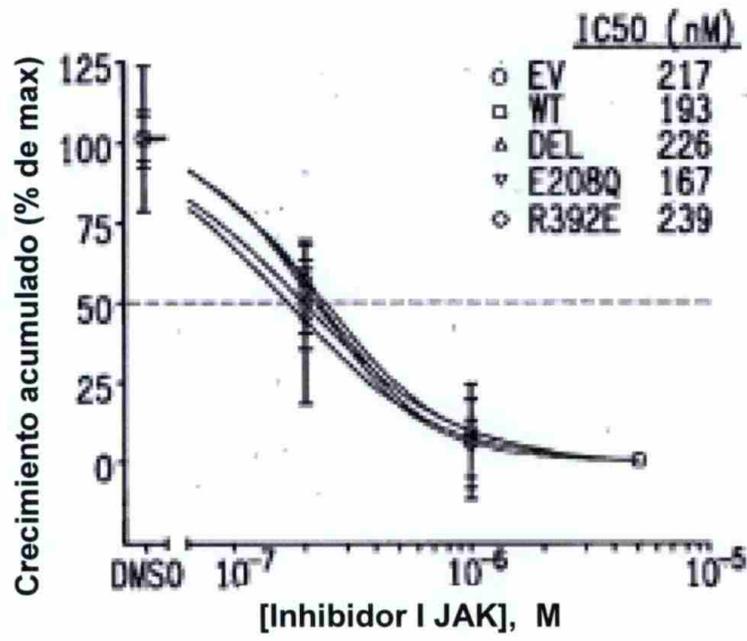


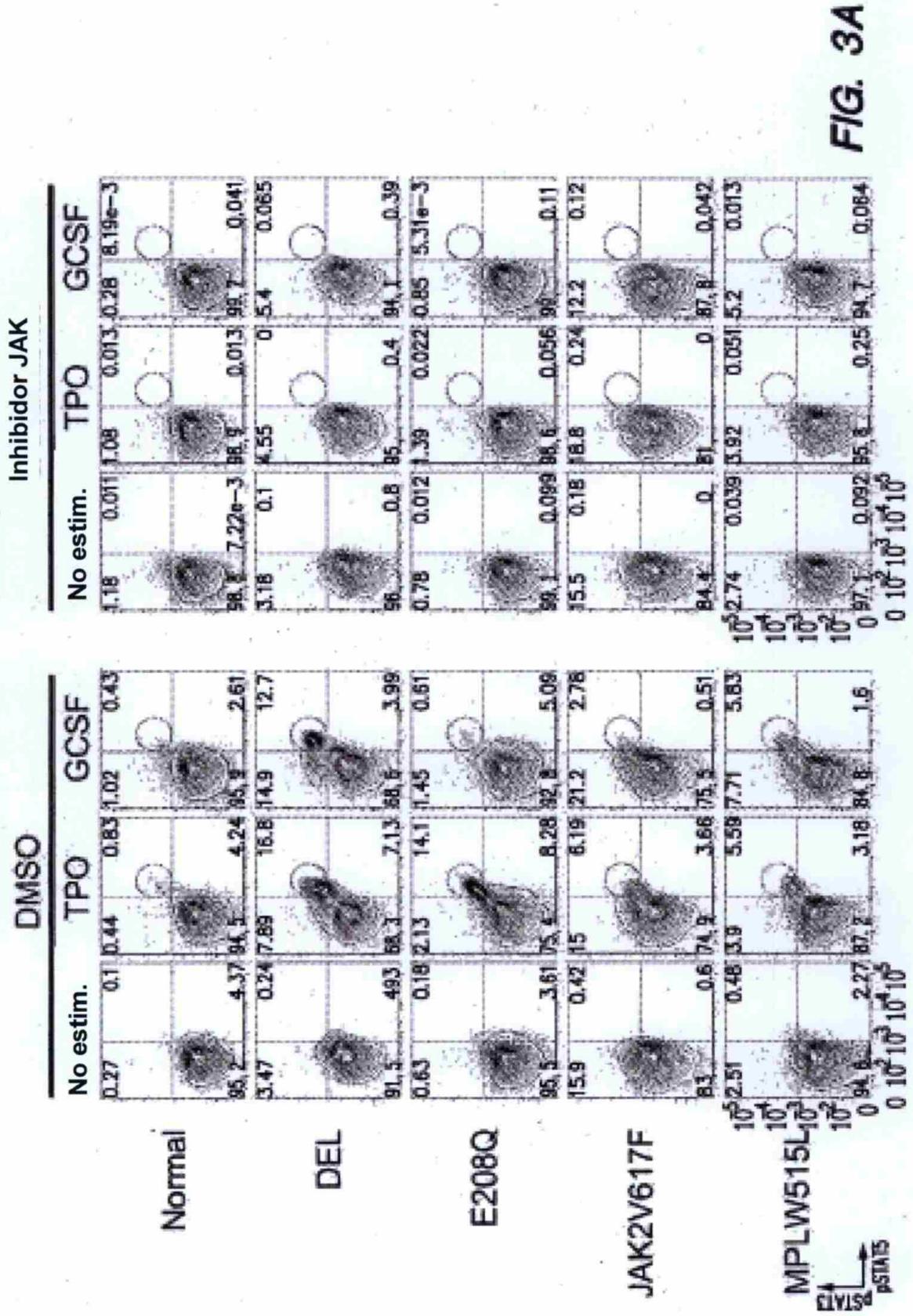
FIG. 2A



**FIG. 2B**



**FIG. 2C**





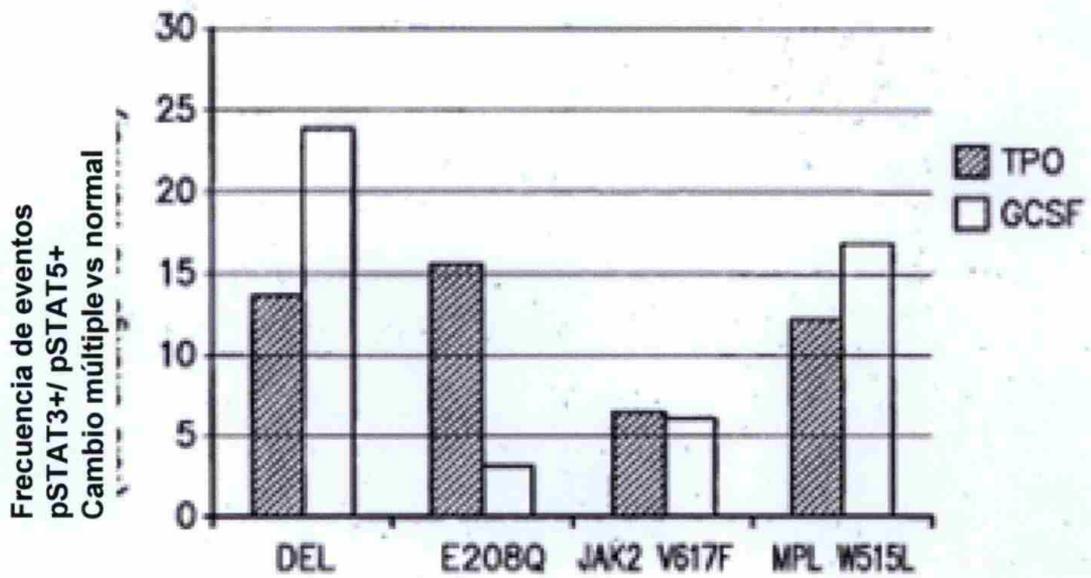
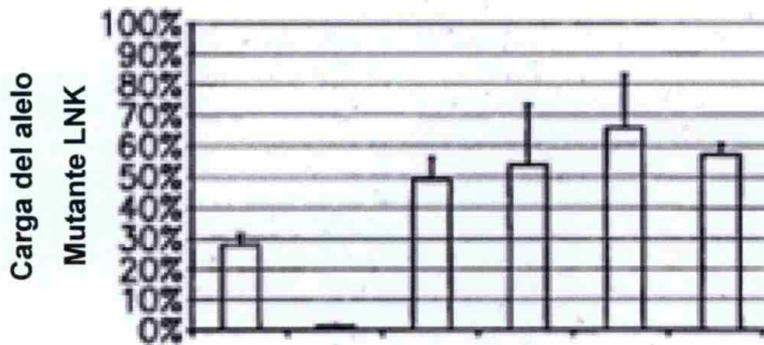


FIG. 3C

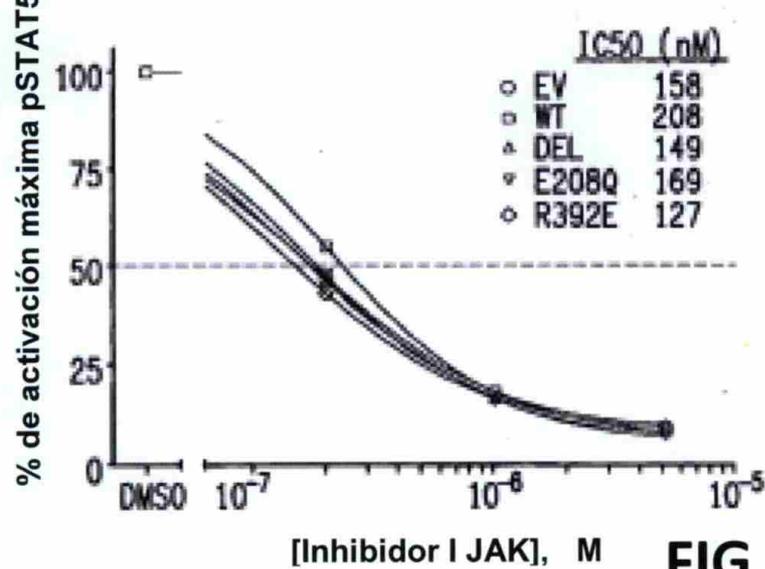
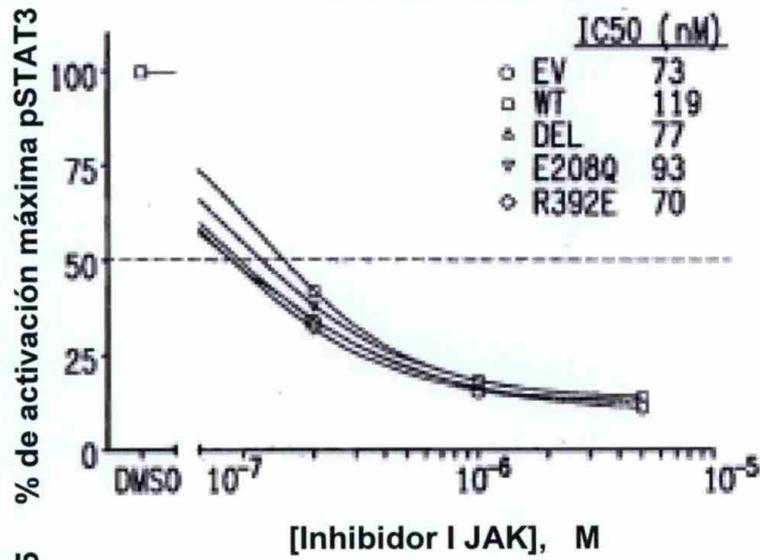
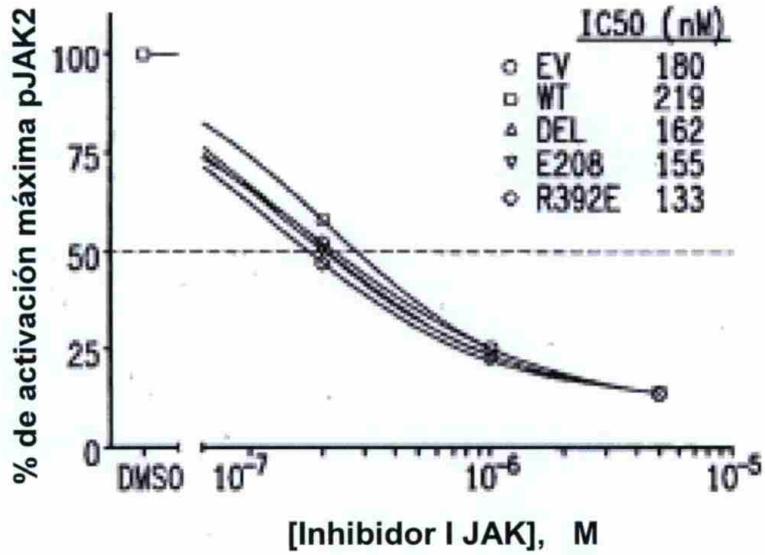


	No clast	Células	Granulocito:	Monocitos maduros	Mieloides inmaduros	pStat5+ pStat3+
CD3	n/a	+	-	-	-	-
CD56	n/a	n/a	+	-	-	-
CD33	n/a	n/a	n/a	+	+	+
CD14	n/a	n/a	n/a	+	-	-
pStat5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	+
pStat3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	+

FIG. 3D

Línea celular	Punto de tiempo	pJAK2 Cambio múltiple	pSTAT3 Cambio múltiple	pSTAT5 Cambio múltiple
EV	0 min	1,0	1,0	1,0
	30 min	3,9	2,4	5,3
	60 min	3,8	2,6	5,4
	120 min	2,5	2,0	3,0
	16 hrs	1,1	1,1	1,1
WT	0 min	1,0	1,0	1,0
	30 min	2,6	1,7	3,5
	60 min	1,9	1,5	2,4
	120 min	1,4	1,4	1,4
	16 hrs	1,1	1,1	1,0
DEL	0 min	1,0	1,0	1,0
	30 min	3,9	2,4	5,2
	60 min	3,6	2,3	4,5
	120 min	2,2	2,0	2,5
	16 hrs	1,1	1,1	1,0
E208Q	0 min	1,0	1,0	1,0
	30 min	2,7	1,9	4,2
	60 min	2,0	1,5	2,6
	120 min	1,2	1,3	1,4
	16 hrs	1,0	1,0	0,9
R392E	0 min	1,0	1,0	1,0
	30 min	3,7	2,4	5,1
	60 min	3,7	2,5	4,9
	120 min	3,3	2,6	4,3
	16 hrs	1,0	1,0	0,9

FIG. 4



**FIG. 5**

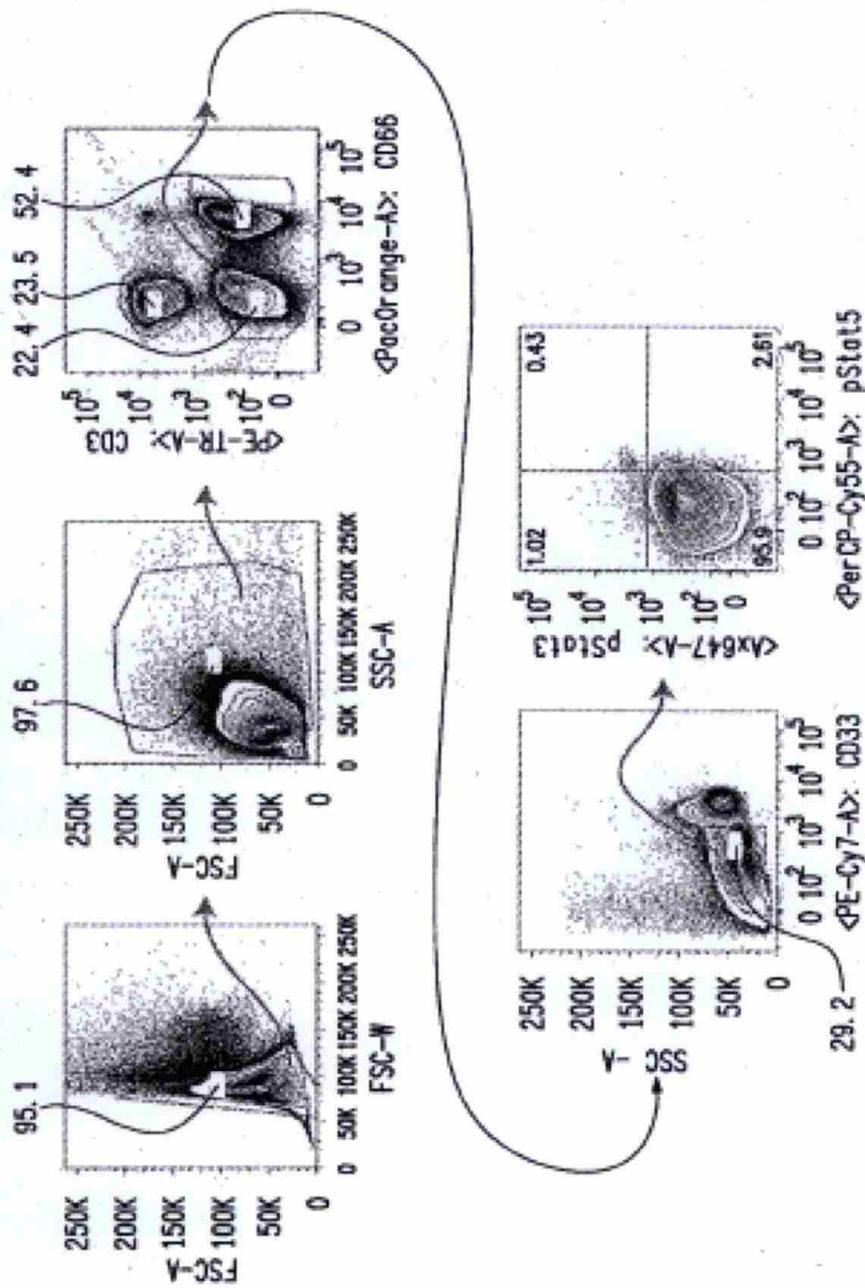
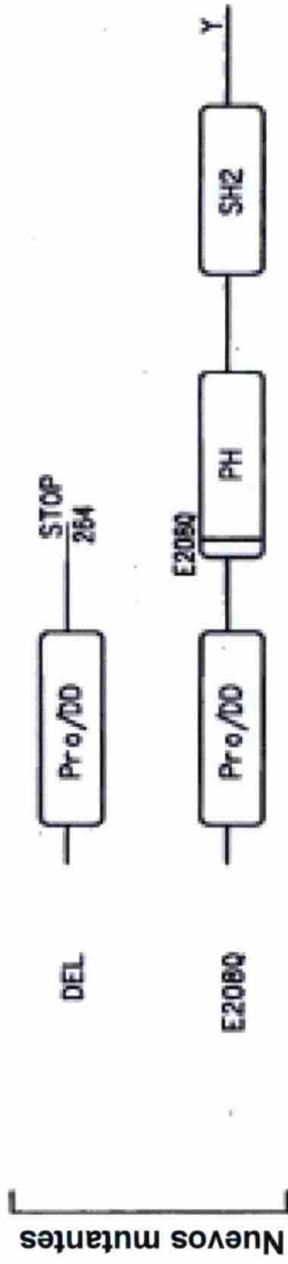


FIG. 6

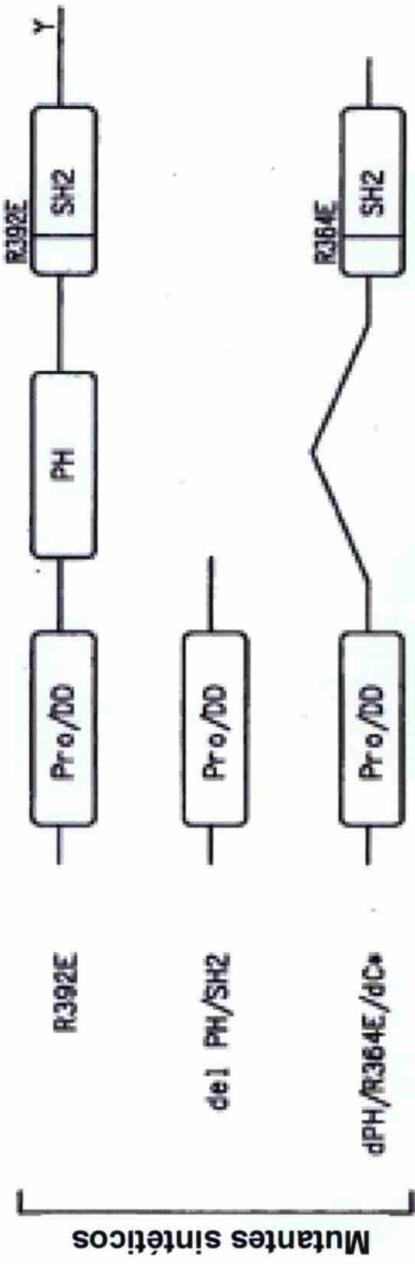
**FIG. 7A**



**FIG. 7B**



**FIG. 7C**



\* Derivado de murina Ink- R364E es análogo a R392E en Ink humano