

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 174**

51 Int. Cl.:

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/4545 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010 E 14184691 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2881402**

54 Título: **Expresión de ROS mutante en el cáncer de hígado humano**

30 Prioridad:

12.02.2009 US 207484 P

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

11.10.2017

73 Titular/es:

**CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
3 Trask Lane
Danvers, MA 01923, US**

72 Inventor/es:

**GU, TING-LEI;
TUCKER, MEGHAN, ANN;
HAACK, HERBERT;
CROSBY, KATHERINE, ELEANOR y
RIMKUNAS, VICTORIA, MCGUINNESS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 174 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

Expresión de ROS mutante en el cáncer de hígado humano

Campo de la invención

5 La invención se refiere, en general, a proteínas ROS quinasa y a genes que participan en el cáncer, y al tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 Muchos cánceres se caracterizan por alteraciones en las vías de señalización celular que conducen a un control aberrante de los procesos celulares, o a un crecimiento y a una proliferación incontrolados de las células. Estas alteraciones suelen estar provocadas por cambios en la actividad de determinadas proteínas de señalización tales como las quinasas.

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

20 Se han descrito translocaciones de genes que conducen a proteínas mutantes o de fusión implicadas en una variedad de otros cánceres. Por ejemplo, Falini *et al.*, *Blood* 99(2): 409-426 (2002), revisan las translocaciones que se sabe que aparecen en los cánceres hematológicos.

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

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

40 El documento W02007/084631 describe una nueva translocación génica en carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) que da lugar a una proteína de fusión que combina parte de SLC34A2 con la ROS quinasa, y proporciona polinucleótidos y vectores que codifican los polipéptidos de ROS quinasa mutante descritos, sondas para detectarlos, polipéptidos mutantes aislados, polipéptidos recombinantes y reactivos de detección de los polipéptidos de fusión y truncados.

Compendio de la invención

45 La invención es como se reivindica en las reivindicaciones 1-8.

50 En la presente memoria, se describe una translocación génica que implica el gen de la ROS quinasa en el cáncer humano, tal como el cáncer de hígado, riñón, páncreas y testicular (incluyendo el cáncer de los conductos de estos tejidos, tales como el cáncer hepático de conducto biliar), que da lugar a proteínas de fusión que combinan parte de la proteína FIG (una proteína del aparato de Golgi) con el dominio quinasa de la ROS quinasa. Las proteínas de fusión FIG-ROS (en concreto, FIG-ROS(S), FIG-ROS(L) y FIG-ROS(XL)) conservan la actividad de la ROS tirosina quinasa. La invención proporciona el tratamiento del cáncer humano tal como el cáncer de hígado, riñón, páncreas y testicular (incluyendo el cáncer de los conductos de estos tejidos, tales como el cáncer hepático de conducto biliar), que no solo surge de translocaciones génicas que implican la ROS quinasa, sino también de la expresión aberrante de la ROS quinasa en estos tejidos. En la presente memoria, también se describe una ROS quinasa truncada,

mediante la que el dominio quinasa (con o sin el dominio transmembrana) de la ROS quinasa está activo, pero separado del resto de la ROS quinasa de longitud completa (p. ej., separado del dominio extracelular de la proteína ROS). La expresión de una ROS quinasa mutante con actividad quinasa activa puede conducir a la proliferación y supervivencia de cánceres hepáticos, pancreáticos, renales y testiculares en un subconjunto de dichos cánceres en los que se expresa una ROS quinasa truncada con actividad quinasa activa.

Por consiguiente, en la presente memoria, se describe un polipéptido de fusión FIG-ROS purificado. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 16.

También se describe en la presente memoria un polinucleótido de fusión FIG-ROS purificado. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16.

También se describe en la presente memoria un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS. En algunas realizaciones, el agente de unión se une específicamente a una unión de fusión entre una parte FIG y una parte ROS en dicho polipéptido de fusión FIG-ROS. En algunas realizaciones, la unión de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AGSTLP, LQVWHR y LQAGVP. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS es un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), es un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL) o es un polipéptido de fusión FIG-ROS (L). En algunas realizaciones, el agente de unión es un anticuerpo y un péptido AQUA. En algunas realizaciones, el péptido AQUA comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AGSTLP, LQVWHR y LQAGVP.

En la presente memoria, también se describe una sonda nucleotídica para detectar un polinucleótido de fusión FIG-ROS, en donde dicha sonda se hibrida con dicho polinucleótido de fusión FIG-ROS en condiciones rigurosas. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17.

En la presente memoria, también se describe un método de detección de una translocación del gen de FIG-ROS, método que comprende la puesta en contacto de una muestra biológica con un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS (p. ej., un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (L)), donde la unión específica del agente de unión a la muestra biológica indica la presencia de una translocación del gen de FIG-ROS (p.ej., que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (L)), en dicha muestra biológica.

En la presente memoria, también se describe un método de detección de una translocación del gen de FIG-ROS mediante la puesta en contacto de una muestra biológica con una sonda nucleotídica que se hibrida con un polinucleótido de fusión FIG-ROS en condiciones rigurosas, en donde la hibridación de dicha sonda nucleotídica a dicha muestra biológica indica una translocación del gen de FIG-ROS (p.ej., que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (L)) en dicha muestra biológica.

También se describe en la presente memoria un método de diagnóstico de un paciente que tiene un cáncer o cáncer sospechoso caracterizado por una ROS quinasa. En algunas realizaciones, el cáncer o cáncer sospechoso no es carcinoma pulmonar no microcítico ni glioblastoma. El método incluye poner en contacto una muestra biológica de dicho cáncer o cáncer sospechoso (donde la muestra biológica comprende al menos un polipéptido) con un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS mutante, en donde la unión específica de dicho agente de unión a al menos un polipéptido en dicha muestra biológica identifica a dicho paciente como aquel que tiene un cáncer o un cáncer sospechoso caracterizado por una ROS quinasa.

También se describe en la presente memoria un método de identificación de un cáncer (o un cáncer sospechoso) que es probable que responda a un inhibidor de ROS. En algunas realizaciones, el cáncer o cáncer sospechoso no es carcinoma pulmonar no microcítico ni glioblastoma. El método incluye poner en contacto una muestra biológica de dicho cáncer (o cáncer sospechoso) que comprende al menos un polipéptido con un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS mutante, en donde la unión específica de dicho agente de unión a al menos

un polipéptido en dicha muestra biológica identifica dicho cáncer o cáncer sospechoso como un cáncer o cáncer sospechoso que es probable que responda a un inhibidor de ROS.

5 En diversas realizaciones, el polipéptido ROS mutante es un polipéptido ROS de tipo silvestre expresado de forma aberrante. Por ejemplo, la expresión aberrante puede ser cuando la ROS quinasa de tipo silvestre está sobreexpresada en un cáncer o un cáncer sospechoso en comparación con el nivel de expresión de la ROS quinasa de tipo silvestre en tejido normal del mismo tipo de tejido que el cáncer o cáncer sospechoso. Los niveles de expresión de la proteína ROS se pueden determinar por medios convencionales (p.ej., análisis de transferencia Western, espectrometría de masas, tinción con IHC).

10 En diversas realizaciones, el polipéptido ROS mutante es un polipéptido ROS truncado o un polipéptido de fusión ROS. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos de fusión ROS incluyen un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), un polipéptido de fusión FIG-ROS (L), un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL), un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS (S), un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS (L), un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS (VS) y un polipéptido de fusión CD74-ROS. Los ejemplos no limitantes de un polipéptido ROS truncado incluyen el dominio quinasa de ROS que carece de los dominios extracelular y transmembrana de la ROS de tipo silvestre, y los dominios transmembrana y quinasa de ROS que carecen del dominio extracelular de ROS de tipo silvestre.

15 En algunas realizaciones, el agente de unión es un anticuerpo y un péptido AQUA. En algunas realizaciones, el cáncer es de un paciente (p.ej., un paciente humano).

20 También se describe en la presente memoria un método de diagnóstico de un paciente que tiene un cáncer o cáncer sospechoso caracterizado por una ROS quinasa. En algunas realizaciones, el cáncer o cáncer sospechoso no es carcinoma pulmonar ni glioblastoma. El método incluye poner en contacto una muestra biológica de dicho cáncer o cáncer sospechoso (donde la muestra biológica comprende al menos una molécula de ácido nucleico) con una sonda que se hibrida en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en un polinucleótido de fusión FIG-ROS, un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS, un polipéptido de fusión CD74-ROS y un polinucleótido ROS truncado, y en donde la hibridación de dicha sonda con al menos una molécula de ácido nucleico en dicha muestra biológica identifica que dicho paciente tiene un cáncer o un cáncer sospechoso caracterizado por una ROS quinasa.

25 También se describe en la presente memoria un método de identificación de un cáncer (o un cáncer sospechoso) que es probable que responda a un inhibidor de ROS. El método incluye poner en contacto una muestra biológica de dicho cáncer que comprende al menos una molécula de ácido nucleico con una sonda nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas bien con un polinucleótido de fusión FIG-ROS (p.ej., un polinucleótido de fusión FIG-ROS (S) o FIG-ROS (L)) o un polinucleótido ROS mutante, y en donde la hibridación de dicha sonda nucleotídica con al menos una molécula de ácido nucleico en dicha muestra biológica identifica dicho cáncer como un cáncer que es probable que responda a un inhibidor de ROS.

30 En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), un polipéptido de fusión FIG-ROS (L) o un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL). En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión SCL34A2-ROS codifica un polipéptido de fusión SCL34A2-ROS (S), un polipéptido de fusión SCL34A2-ROS (L) o un polipéptido de fusión SCL34A2-ROS (VS). En algunas realizaciones, el cáncer es de un paciente (p.ej., un paciente de cáncer). En algunas realizaciones, el paciente es un ser humano.

35 En diversas realizaciones de todos los aspectos de la invención, el cáncer puede ser un cáncer de hígado, un cáncer de páncreas, un cáncer de riñón o un cáncer de testículo. En diversas realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer de conducto (p.ej., un cáncer de conducto biliar hepático o un cáncer de conducto pancreático). En otras realizaciones, el cáncer no es un cáncer pulmonar ni microcítico (CPNM). En otras realizaciones, el cáncer no es un glioblastoma. En otras realizaciones, el inhibidor de ROS también inhibe la actividad de una ALK quinasa, una LTK quinasa, un receptor de insulina o un receptor de IGF1. En la presente invención, el inhibidor de ROS es PF-02341066 o NVP-TAE684.

40 En realizaciones adicionales descritas en la presente memoria, el inhibidor de ROS es un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS, un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS truncado, un ARNip dirigido a un polinucleótido de fusión FIG-ROS o un ARNip dirigido a un polinucleótido ROS truncado.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra la ubicación del gen de FIG y del gen ROS en el cromosoma 6. Ambos genes FIG y ROS están situados en el cromosoma 6q22.2 con aproximadamente 0,2 Mega pares de bases separados. El gen de FIG también se conoce como el gen GOPC.

55 La Fig. 2 muestra el punto de corte de las proteínas FIG y ROS, que forman dos proteínas de fusión FIG-ROS. La proteína de fusión FIG-ROS (L) resulta de las roturas de los genes Fig y Ros en las flechas negras, mientras que la proteína de fusión FIG-ROS (S) resulta de las roturas en los genes Fig y Ros en las flechas rojas.

La Fig. 3 es una representación de un gel de agarosa que muestra la detección de las transcripciones de los dos genes de fusión, FIG-ROS (S) y FIG-ROS (L) formados por la translocación de FIG y ROS por RT-PCR en muestras de cáncer de hígado de dos pacientes, en concreto, XY3-78T y 090665LC.

5 La Fig. 4 es una representación de un gel de agarosa que muestra la expresión de FIG de tipo silvestre, ROS de tipo silvestre y la transcripción de fusión de FIG-ROS por RT-PCR en las muestras de cáncer de hígado de dos pacientes, en concreto, XY3-78T y 090665LC. También se muestra la estirpe celular de glioblastoma humano U118MG, que tiene una translocación FIG-ROS (L). HCC78, una estirpe celular humana de cáncer pulmonar no microcítico, que contiene la translocación SLC34A2-ROS, sirvió como control negativo.

10 La Fig. 5 es una representación de un gel de agarosa que muestra los productos de la PCR generados mediante la amplificación del ADN genómico de muestras de cáncer de hígado de los pacientes XY3-78T y 090665LC, y de la estirpe celular U118MG.

La Fig. 6 es una representación de un análisis de transferencia Western que muestra la expresión de FIG-ROS (S) de XY3-78T, FIG-ROS (L) de 090665LC y FIG-ROS (L) de células U118MG.

15 La Fig. 7 es una fotografía de cuatro placas de cultivo tisular que contienen células 3T3 cultivadas en agar blando, donde las células 3T3 se transfectan establemente con FIG-ROS (L) (superior izquierda), FIG-ROS (S) (superior derecha), src quinasa (inferior izquierda) y vector vacío (inferior derecha).

La Fig. 8 es una fotografía que muestra ratones desnudos inyectados con células 3T3 transfectadas de forma estable con vector vacío (izquierda), FIG-ROS (L) (medio) o FIG-ROS (S).

20 Las Fig. 9A y 9B son fotografías de células que muestran la ubicación subcelular de FIG-ROS (L) y FIG-ROS (S) en células 3T3.

La Fig. 10 es una representación de un análisis de transferencia Western que muestra la expresión estable de FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) y FIG-ROS (L) de U118MG en células BaF3 cultivadas con o sin IL-3.

25 La Fig. 11 es un gráfico lineal que muestra la capacidad de las células BAF3 transducidas con retrovirus que codifican FIG-ROS (S) (cuadrados rojos) o FIG-ROS (L) (diamantes azules) para crecer sin la presencia de IL-3. También se muestran células BAF3 transducidas con retrovirus vacío (línea púrpura claro).

La Fig. 12 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de quinasa *in vitro* (superior) realizado cuantificando las bandas en el gel (debajo) de células BaF3 transducidas con retrovirus que codifican FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) o virus vacío ("neo").

30 La Fig. 13 es un gráfico lineal que muestra la respuesta del crecimiento celular en presencia de TAE-684 0 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM o 1000 nM de BaF3 que expresan FIG-ROS (S) (cuadrados rojos), BaF3 que expresan FIG-ROS (L) (diamantes azules), BaF3 que expresan FLT3ITD (triángulos verdes) y células Karpas 299 (X moradas)

La Fig. 14 es un gráfico de barras que muestra que las BaF3 que expresan bien FIG-ROS (S) o FIG-ROS (L) mueren por apoptosis en presencia de TAE-684.

35 La Fig. 15 es una representación de un análisis de transferencia Western que muestra que la fosforilación tanto de FIG-ROS (S) como de FIG-ROS (L), así como sus moléculas de señalización cadena abajo, son inhibidas por TAE-684.

La Fig. 16 es una representación esquemática de los diversos clones de BAC que se hibridan con los genes FIG y ROS.

40 La Fig. 17 es una imagen de un portaobjetos de IHC de una muestra de tejido de CCA no limitante representativa que se tiñe positiva para la expresión de ROS.

La Fig. 18 es una imagen de un portaobjetos de IHC de una muestra de tejido de HCC no limitante representativa que se tiñe moderadamente positiva para la expresión de ROS.

45 Las Fig. 19A y 9B son imágenes de portaobjetos de IHC no limitantes representativos teñidos con el anticuerpo específico de ROS tras la adición del péptido ROS-1 (Fig. 19A) y del péptido ROS-9 (Fig. 19B).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

50 En la presente memoria, se describe una ROS quinasa mutante que se expresa en un subconjunto de cánceres hepáticos, renales, pancreáticos y testiculares humanos (p.ej., cáncer hepático de conducto biliar). La ROS quinasa mutante puede impulsar la proliferación y la supervivencia de cánceres hepáticos, pancreáticos, renales y testiculares en un subconjunto de dichos cánceres en los que se expresa la ROS quinasa mutante.

Aspectos, ventajas y realizaciones adicionales de la invención se describen más detalladamente más adelante. Cualquier conflicto entre una definición conocida en la técnica de un término o de una expresión y de una definición del término o de la expresión como se enseñan específicamente en la presente memoria descriptiva se resolverá a favor de esta última. Como se emplean en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados. Como se emplean en la presente memoria descriptiva, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" también abarcan específicamente las formas en plural de los términos a los que se refieren, a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. El término "aproximadamente" se usa en la presente memoria para referirse a aproximadamente, en la región de, más o menos, o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un intervalo numérico, modifica dicho intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" se usa en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado en una varianza del 20 %.

Los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención, a menos que se defina lo contrario. Se hace referencia en la presente memoria a diversas metodologías y materiales conocidos por los expertos en la técnica. Los trabajos de referencia convencionales que exponen los principios generales de la tecnología del ADN recombinante incluyen Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989); Kaufman *et al.*, Eds., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, Ed., "Directed Mutagenesis: A Practical Approach", IRL Press, Oxford (1991). Los trabajos de referencia convencionales que establecen los principios generales de la farmacología incluyen "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 11ª Ed., McGraw Hill Companies Inc., Nueva York (2006).

La invención se refiere al descubrimiento de ROS mutantes (es decir, ROS de longitud completa expresadas de forma aberrante, ROS truncadas (es decir, de menor longitud) o proteínas de fusión ROS (p. ej., fusiones FIG-ROS, fusiones SLC34A2-ROS o la fusión CD74-ROS)) en cáncer de hígado (incluyendo cáncer de conducto biliar), cáncer de páncreas, cáncer de riñón y cáncer testicular. La invención se refiere además al descubrimiento de nuevas translocaciones de genes ROS que producen fusiones entre el gen de FIG y el gen ROS.

La ROS quinasa de longitud completa (tipo silvestre) es una tirosina quinasa receptora larga de 2.347 aminoácidos. En los seres humanos, se ha detectado ARN de la ROS quinasa en la placenta, el pulmón y el músculo esquelético, con posibles niveles bajos de expresión en los testículos (véase J. Acquaviva, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1795(1): 37-52, 2009. Sin embargo, la ROS quinasa de longitud completa no parece estar expresada en el hígado, el riñón y el tejido pancreático normales en seres humanos (véase J. Acquaviva, *et al.*, *supra*). Mientras Abeam Inc. (Cambridge, MA) comercializa un anticuerpo específico de ROS (clon ab5512) que supuestamente tiñe (es decir, se une específicamente a) tejido de hepatocarcinoma humano mediante IHC, se descubrió que este ab5512 tiñe las células HCC78 embebidas en parafina (carcinoma de pulmón que expresa ROS) y las células HCC827 (adenocarcinoma de pulmón que no expresa ROS) con igual intensidad (células obtenidas de la ATCC, datos no mostrados). Además, aunque la ROS quinasa puede estar presente en tejido testicular humano, su expresión parece estar limitada al epidídimo (véase Acquaviva, *et al.*, *supra*).

Por consiguiente, en la presente memoria, se describe un polipéptido de fusión FIG-ROS purificado. Por "polipéptido de fusión FIG-ROS" se entiende el polipéptido de fusión FIG-ROS (p.ej., FIG-ROS (L), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (S)) descrito en la presente memoria, obtenido de cualquier especie, en particular, de mamíferos, incluyendo bovinos, ovinos, porcinos, murinos, equinos y seres humanos, de cualquier fuente, bien natural, sintética, semisintética o recombinante.

Por "purificado/a" (o "aislado/a") se entiende a una secuencia de ácido nucleico (p.ej., un polinucleótido) o una secuencia de aminoácidos (p. ej., un polipéptido) que se retira o se separa de otros componentes presentes en su entorno natural. Por ejemplo, un polipéptido de fusión FIG-ROS aislado es aquel que está separado de otros componentes de una célula eucariota (p. ej., proteínas del retículo endoplasmático o citoplasmáticas y ARN). Un polinucleótido FIG-ROS aislado es aquel que está separado de otros componentes nucleares (p.ej., histonas) y/o de secuencias de ácido nucleico cadena arriba o cadena abajo (p. ej., un polinucleótido FIG-ROS aislado separado del promotor del gen de FIG endógeno). Una secuencia de ácido nucleico aislada de la secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria está al menos un 60 % exenta, o al menos un 75 % exenta, o al menos un 90 % exenta, o al menos un 95 % exenta de otros componentes presentes en el medio natural de la secuencia de ácido nucleico o de ácido indicada.

Un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria es un ejemplo no limitante de polipéptido ROS mutante.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión polipéptido o polinucleótido "ROS mutante" significa bien la expresión aberrante del polipéptido o polinucleótido ROS quinasa de tipo silvestre en un tejido en el que la ROS quinasa no se expresa normalmente (o se expresa a un nivel diferente) o el dominio quinasa de una ROS o un polinucleótido que codifica el dominio quinasa de una ROS quinasa sin el dominio extracelular o sin los dominios transmembrana de ROS de tipo silvestre (es decir, de longitud completa), donde el dominio quinasa (con o sin el dominio transmembrana) bien está solo (también denominado ROS truncado) o está fusionado a toda o una parte de

una segunda proteína (p.ej., una proteína FIG).

La ROS quinasa de tipo silvestre es una tirosina quinasa receptora de 2.347 aminoácidos de longitud, en donde aproximadamente los 36 primeros aminoácidos (es decir, los 36 aminoácidos N-terminales) son el péptido señal. La secuencia de ROS quinasa humana se puede encontrar en el número de acceso del GenBank M34353, y la secuencia de proteínas (incluyendo el péptido señal) se proporciona en la presente memoria como la SEQ ID NO: 9.

Los ejemplos no limitantes del polipéptido ROS mutante descrito en la presente memoria incluyen polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. Asimismo, en ciertas realizaciones, los ejemplos no limitantes de polinucleótidos ROS mutantes descritos en la presente memoria incluyen polinucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, el polinucleótido ROS mutante comprende una parte de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones, el polipéptido ROS mutante descrito en la presente memoria no incluye las secuencias de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. Asimismo, en ciertas realizaciones, los ejemplos no limitantes de polinucleótidos ROS mutantes descritos en la presente memoria no incluyen polinucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

Por lo tanto, una ROS mutante comprende el dominio quinasa, con o sin el dominio transmembrana, de ROS (o secuencias de nucleótidos que codifican el mismo) de manera que el dominio quinasa de la ROS quinasa (con o sin el dominio transmembrana) se separa de los otros dominios (p.ej., el dominio extracelular) de ROS quinasa de tipo silvestre (es decir, de longitud completa). La secuencia de aminoácidos de longitud completa de ROS quinasa se proporciona en SEQ ID NO: 9. El dominio quinasa de la ROS quinasa se proporciona en SEQ ID NO: 12 y 13; sin embargo, la expresión "ROS mutante" también incluye aquellos restos de aminoácidos que flanquean el dominio quinasa siempre que los restos de aminoácidos flanqueantes no estén dentro del dominio transmembrana ni del dominio extracelular de la proteína ROS de longitud completa. En algunas realizaciones, la ROS mutante excluye la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, la ROS mutante excluye la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10. Por lo tanto, la ROS mutante descrita en la presente memoria incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y una secuencia de nucleótidos que codifica la misma. La expresión "polipéptido ROS mutante" también incluye una proteína quimérica que incluye toda o parte de una segunda proteína fusionada por un enlace peptídico al dominio quinasa de un polipéptido ROS. Como se describió anteriormente, un ejemplo no limitante de un polipéptido ROS mutante que es una proteína quimérica es el polipéptido de fusión FIG-ROS (S) descrito en la presente memoria. Del mismo modo, la expresión "polinucleótido ROS mutante" también incluye un polinucleótido que codifica una proteína quimérica que incluye toda o parte de una segunda proteína fusionada por un enlace peptídico al dominio quinasa de un polipéptido ROS.

Por lo tanto, como se emplea en la presente memoria, la expresión ROS mutante incluye, sin limitación, el polipéptido de fusión FIG-ROS (L) (véase la secuencia de ácido nucleico en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 2), el polipéptido de fusión FIG-ROS (S) (véase la secuencia de ácido nucleico en SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 4), el polipéptido de fusión FIG-ROS (XL) (véase la secuencia de ácido nucleico en SEQ ID NO: 16 y la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 17), el polipéptido de fusión SLC34A2-ROS (L) (véase la secuencia de ácido nucleico en SEQ ID NO: 18 y la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 19), la proteína de fusión SLC34A2-ROS (S) (véase la secuencia de ácido nucleico en SEQ ID NO: 20 y la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 21), la proteína de fusión SLC34A2-ROS (VS) (véase la secuencia de ácido nucleico en SEQ ID NO: 22 y la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 23), y la proteína de fusión CD74-ROS (véase la secuencia de ácido nucleico en SEQ ID NO: 24 y la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 25). Cabe señalar que en la publicación PCT n.º WO2007084631; Rikova, K *et al.*, *Cell* 131:1190-1203, 2007, y la publicación PCT n.º WO/2009/051846, se describen polipéptidos de fusión ROS adicionales.

Como se emplea en la presente memoria, por "polinucleótido" (o "secuencia de nucleótidos" o "molécula de ácido nucleico") se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y fragmentos o partes de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que puede ser monocatenario o bicatenario, y representar la cadena sentido o antisentido.

Como se emplea en la presente memoria, por "polipéptido" (o "secuencia de aminoácidos" o proteína) se entiende una secuencia de oligopéptido, péptido, polipéptido o proteína, y fragmentos o partes de la misma, y a moléculas naturales o sintéticas. La "secuencia de aminoácidos" y los términos similares, tales como "polipéptido" o "proteína", no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos indicada a la secuencia de aminoácidos nativa completa, asociada con la molécula de proteína citada.

En la presente memoria, se describe la translocación del gen de FIG-ROS humana que se ha identificado usando el perfil fosfopeptídico global en muestras de cáncer de hígado tomadas de pacientes humanos (véanse los ejemplos que se presentan a continuación). Estas translocaciones de genes que se producen en el cromosoma humano (6q22) producen la expresión de dos proteínas de fusión variantes, en concreto, el polipéptido de fusión FIG-ROS (S) y el polipéptido de fusión FIG-ROS (L) que combinan el extremo N-terminal de FIG con el dominio quinasa de ROS.

Como se emplea en la presente memoria, por "cáncer" o "canceroso" se entiende una célula que muestra un crecimiento anormal en comparación con una célula normal (es decir, no cancerosa) del mismo tipo. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser metastásica o no metastásica. Una célula cancerosa también puede mostrar falta de inhibición de contacto donde una célula normal de ese mismo tipo de célula muestra inhibición de contacto. Como se emplea en la presente memoria, por "cáncer sospechoso" o "tejido sospechoso de ser canceroso" se entiende una célula o un tejido que tiene algunas características aberrantes (p.ej., hiperplasia o falta de inhibición de contacto) en comparación con células o tejidos normales de ese mismo tipo de célula o de tejido como el cáncer sospechoso, pero donde la célula o el tejido aún no ha sido confirmado por un médico o patólogo como canceroso.

Como se muestra en las Fig. 1 y 2, la translocación de FIG-ROS (L) combina la secuencia de ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de FIG (aminoácidos 1-412) con las secuencias de ácido nucleico que codifican el dominio quinasa de ROS (aminoácidos 413-878 que corresponden a los aminoácidos 1.882-2.347 de ROS) (véase SEC ID N°: 2), para producir una fusión, es decir, el polipéptido de fusión FIG-ROS (L). Se encontró que la proteína de fusión FIG-ROS (L) resultante, que comprende 878 aminoácidos, conserva la actividad quinasa de ROS. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS es un polipéptido de fusión FIG-ROS (L). En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS (L) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS (L) está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1.

Como se muestra en las Fig. 1 y 2, la translocación de FIG-ROS (S) combina la secuencia de ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de FIG (aminoácidos 1-209) con la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio quinasa de ROS (aminoácidos 210-630 que corresponden a los aminoácidos 1.927-2.347 de ROS) (véase también SEC ID N°: 4), para producir una fusión, es decir, el polipéptido de fusión FIG-ROS (S). Se encontró que la proteína de fusión FIG-ROS (s) resultante, que comprende 630 aminoácidos, conserva la actividad quinasa de ROS. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria es un polipéptido de fusión FIG-ROS (S). En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS (S) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS (S) está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 3.

En la presente memoria, también se describe una tercera fusión FIG-ROS, en concreto, FIG-ROS (XL), cuya translocación combina la secuencia de ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de FIG (aminoácidos 1-411 o 1-412) con las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios transmembrana y quinasa de la ROS quinasa para dar lugar a una proteína de fusión de 1.009 aminoácidos de longitud.

Se ha de señalar que en todas las proteínas de fusión ROS descritas en la presente memoria (p.ej., las proteínas de fusión FIG-ROS, las proteínas de fusión SLC34A2-ROS y la proteína de fusión CD74-ROS), el aminoácido en la unión de fusión (independientemente de la numeración) puede aparecer en cualquier miembro proteico de tipo silvestre de la fusión (p. ej., el aminoácido en la unión de fusión en un polipéptido de fusión FIG-ROS puede aparecer tanto en la proteína FIG de tipo silvestre como en la proteína ROS de tipo silvestre) o el aminoácido, creado por un codón con nucleótidos de exones fusionados de ambos miembros proteicos, puede ser único para el polipéptido de fusión y no aparecer en ningún miembro proteico de tipo silvestre de la fusión.

La invención permite que las ROS mutantes puedan estar presentes en cáncer hepático (incluyendo cáncer de conducto biliar), cáncer de riñón, cáncer testicular y cáncer de páncreas. Basándose en estos hallazgos, los pacientes que padecen estos cánceres cuyos cánceres expresan ROS mutante (p.ej., sobreexpresan ROS de tipo silvestre o expresan una ROS truncada o un polipéptido de fusión ROS tal como uno de los polipéptidos de fusión FIG-ROS descritos en la presente memoria) pueden responder favorablemente a la administración de un inhibidor de ROS (p. ej., el crecimiento de su cáncer puede disminuir o detenerse en comparación con pacientes no tratados que padecen el mismo cáncer).

En la presente memoria, se describen polipéptidos de fusión de FIG-ROS aislados y fragmentos de los mismos. El polipéptido aislado puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica o al menos un 99 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (c) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS que comprende todo o una parte del polipéptido FIG con el dominio quinasa de ROS (p. ej., SEQ ID NO: 12 o 13)); y (d) una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido que comprende al menos seis aminoácidos contiguos que abarcan la unión de fusión de un polipéptido de fusión FIG-ROS (p. ej., AGSTLP de FIG-ROS (S), LQVWHR de FIG-ROS(L), o LOAGVP de FIG-ROS(XL)).

También se describe en la presente memoria un polipéptido de fusión FIG-ROS (S) aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. El polipéptido de fusión FIG-ROS (XL) aislado puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17. En otra realización, en la presente memoria, se proporcionan polipéptidos mutantes recombinantes, que pueden producirse usando un vector recombinante o una célula hospedadora recombinante como se describió anteriormente.

Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de un polipéptido de fusión FIG-ROS pueden variar sin efecto significativo de la estructura o de la función de la proteína mutante. Si se contemplan dichas diferencias en la secuencia, debe recordarse que habrá zonas críticas en la proteína que determinan la actividad (p. ej., el dominio quinasa de ROS). En general, es posible sustituir los restos que forman la estructura terciaria, siempre que se usen restos que desempeñen una función similar. En otros casos, el tipo de resto puede ser completamente irrelevante si la alteración se produce en una región no crítica de la proteína.

En la presente memoria, se describe además una variante de FIG-ROS de un polipéptido de fusión FIG-ROS que muestra una actividad sustancial de la ROS quinasa o que incluye regiones de proteínas FIG y ROS. En algunas realizaciones, una variante de FIG-ROS descrita en la presente memoria contiene sustituciones conservativas en comparación con FIG-ROS (L), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (S). Algunas sustituciones conservativas no limitantes incluyen el intercambio, entre sí, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; el intercambio de los restos hidroxilo Ser y Thr; el intercambio de los restos ácidos Asp y Glu; el intercambio de los restos de amida Asn y Gln; el intercambio de los restos básicos Lys y Arg; y el intercambio de los restos aromáticos Phe y Tyr. Otros ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos conocidas por los expertos en la técnica son: aromáticos: fenilalanina, triptófano, tirosina (p. ej., se reemplaza un resto de triptófano por una fenilalanina); hidrófobos: leucina, isoleucina, valina; polares: glutamina, asparaginas; básicos: arginina, lisina, histidina; ácidos: ácido aspártico, ácido glutámico; pequeños: alanina, serina, treonina, metionina, glicina. Como se indica con detalle anteriormente, se pueden encontrar más directrices sobre qué cambios de aminoácidos son fenotípicamente silenciosos (es decir, no es probable que tengan un efecto perjudicial significativo sobre una función) en Bowie *et al.*, *Science* 247, *supra*.

En algunas realizaciones, una variante puede tener cambios "no conservativos", p. ej., el reemplazo de una glicina por un triptófano. Las variantes similares también pueden incluir eliminaciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. La orientación para determinar qué restos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o eliminados sin abolir la actividad biológica o inmunológica puede encontrarse usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR.

Los polipéptidos de fusión FIG-ROS, sus fragmentos y variantes descritos en la presente memoria pueden proporcionarse en forma aislada o purificada. Una versión producida recombinantemente de un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria se puede purificar esencialmente mediante el método de una sola etapa descrito en Smith y Johnson, *Gene* 67:31-40 (1988).

Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen los polipéptidos de fusión FIG-ROS que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 2 y 4 y 17 (incluyendo o no una secuencia líder), una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido que comprende al menos seis aminoácidos contiguos que abarcan la unión de fusión de un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria, así como polipéptidos que tienen al menos un 90 % de similitud, más preferiblemente al menos un 95 % de similitud, y aún más preferiblemente al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de similitud con los descritos anteriormente.

Por "% de similitud" para dos polipéptidos se entiende una puntuación de similitud producida comparando las secuencias de aminoácidos de los dos polipéptidos usando el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) y los ajustes predeterminados para determinar la similitud. Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman ("Advances in Applied Mathematics" 2: 482-489 (1981)) para encontrar el mejor segmento de similitud entre dos secuencias.

Por polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de referencia de un polipéptido ROS mutante descrito en la presente memoria se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia polipeptídica puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia del polipéptido de fusión FIG-ROS. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 5 % de los restos de aminoácidos de la secuencia de referencia puede suprimirse o sustituirse con otro aminoácido, o un número de aminoácidos de hasta el 5 % de los restos de aminoácidos totales de la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden darse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre restos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una determinada secuencia es, p. ej., un 95 % idéntica a una secuencia de referencia según la presente descripción, los parámetros se establecen, como es evidente, de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia y se permitan huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de restos de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Se podría usar un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria como marcador de peso molecular en geles de SDS-PAGE o en columnas de filtración en gel de tamiz molecular, por ejemplo, usando

métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se describe además más adelante, los polipéptidos descritos en la presente memoria también se pueden usar para generar reactivos específicos de los polipéptidos de fusión, tales como anticuerpos policlonales y monoclonales, que sean útiles en ensayos de detección de la expresión de polipéptidos ROS mutantes como se describe a continuación o como agonistas y antagonistas capaces de potenciar o inhibir la función/actividad de la proteína ROS mutante. Además, dichos polipéptidos se pueden usar en el sistema de dos híbridos de levadura para "capturar" proteínas de unión al polipéptido de fusión FIG-ROS, que también son agonistas y antagonistas candidatos descritos en la presente memoria. El sistema de dos híbridos de levadura se describe en Fields y Song, *Nature* 340: 245-246 (1989).

En la presente memoria, también se describe un péptido o polipéptido que comprende una parte portadora de epítipo de un polipéptido descrito en la presente memoria, tal como un epítipo que comprende la unión de fusión de una variante de polipéptido de fusión FIG-ROS. Un "epítipo" se refiere a bien un epítipo inmunogénico (es decir, capaz de generar una respuesta inmune) o un epítipo antigénico (es decir, la región de una molécula de proteína a la que un anticuerpo puede unirse específicamente). El número de epítopos inmunogénicos de una proteína, en general, es inferior al número de epítopos antigénicos. Véase, p. ej., Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81: 3998-4002 (1983). La producción de anticuerpos específicos del polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria se describe con más detalle a continuación.

Los anticuerpos que se unen específicamente a péptidos o polipéptidos portadores de epítopos son útiles para detectar una proteína imitada, y pueden usarse anticuerpos contra diferentes péptidos para rastrear el destino de diversas regiones de un precursor de proteína que experimenta procesamiento posterior a la traducción. Los péptidos y anticuerpos anti-péptido pueden usarse en una variedad de ensayos cualitativos o cuantitativos para la proteína imitada, p. ej., en ensayos de competición, ya que se ha demostrado que incluso péptidos cortos (p. ej., de aproximadamente 9 aminoácidos) pueden unirse y desplazar a los péptidos más grandes en ensayos de inmunoprecipitación. Véase, p. ej., Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767-778 (1984) en 777. Los anticuerpos anti-péptido descritos en la presente memoria también son útiles para la purificación de la proteína imitada, p. ej., por cromatografía de adsorción usando métodos bien conocidos en la técnica. Los formatos de ensayo inmunológico se describen con más detalle a continuación.

En la presente memoria, también se describen polipéptidos ROS quinasa mutantes recombinantes, y pueden producirse usando polinucleótidos de fusión descritos en la presente memoria, como se describió anteriormente. Por ejemplo, en la presente memoria, se describe un método de producción de un polipéptido de fusión FIG-ROS recombinante mediante el cultivo de una célula hospedadora recombinante (como se describió anteriormente) en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de fusión y la recuperación del polipéptido. Las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento de células hospedadoras y la expresión de polipéptidos recombinantes a partir de dichas células son bien conocidas por los expertos en la técnica.

En la presente memoria, también se describe un polinucleótido de fusión FIG-ROS purificado. Por "polinucleótido de fusión FIG-ROS" o "polinucleótido FIG-ROS" se entiende un gen de translocación de FIG-ROS (es decir, un gen que ha sufrido translocación) o polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS (p. ej., los polipéptidos de fusión FIG-ROS (L), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (S) descritos en la presente memoria), obtenidos de cualquier especie, en particular, de mamíferos, incluyendo bovinos, ovinos, porcinos, murinos, equinos y seres humanos, de cualquier fuente ya sea natural, sintética, semisintética o recombinante.

En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2 En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS comprende una parte de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 26. Como se emplea en la presente memoria, una "parte" o "fragmento" significa un fragmento de secuencia inferior a la secuencia completa (p. ej., una secuencia de 50 nucleótidos es una parte de una secuencia de 100 nucleótidos de longitud). En otras palabras, el polinucleótido de fusión FIG-ROS puede comprender partes de secuencias intrónicas que no codifican ningún aminoácido en el polipéptido de fusión FIG-ROS resultante.

Además, en la presente memoria, se describen polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria, sondas de nucleótidos que se hibridan a dichos polinucleótidos, y métodos, vectores y células hospedadoras para utilizar dichos polinucleótidos para producir polipéptidos de fusión recombinantes. A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias de nucleótidos determinadas mediante la secuenciación de una molécula de ADN en la presente memoria se determinaron usando un secuenciador de ADN

automatizado (tal como el modelo 373 de Applied Biosystems, Inc.) y todas las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por las moléculas de ADN determinadas en la presente memoria se determinaron usando un secuenciador de péptidos automatizado. Como se conoce en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada mediante dicho enfoque automatizado, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en la presente memoria puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas por automatización normalmente son al menos aproximadamente un 90 % idénticas, y más normalmente al menos del aproximadamente 95 % al aproximadamente 99,9 % idénticas a la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse con más precisión mediante otros enfoques, incluyendo métodos de secuenciación manual de ADN bien conocidos en la técnica. Como es también conocido en la técnica, una sola inserción o eliminación en una determinada secuencia de nucleótidos comparada con la secuencia real causará un desplazamiento de fase en la traducción de la secuencia de nucleótidos de manera que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por una secuencia de nucleótidos determinada será completamente diferente de la secuencia de aminoácidos realmente codificada por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto de dicha inserción o eliminación. A menos que se indique otra cosa, cada secuencia de nucleótidos expuesta en la presente memoria se presenta como una secuencia de desoxirribonucleótidos (abreviados como A, G, C y T). Sin embargo, por "secuencia de nucleótidos" de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido se entiende, para una molécula de ADN o polinucleótido, una secuencia de desoxirribonucleótidos, y para una molécula de ARN o un polinucleótido, la secuencia correspondiente de ribonucleótidos (A, G, C y U), donde cada desoxirribonucleótido de timidina (T) de la secuencia de desoxirribonucleótido especificada se reemplaza por el ribonucleótido uridina (U). Por ejemplo, la referencia a una molécula de ARN que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o expuesta usando las abreviaturas de desoxirribonucleótidos se pretende indicar una molécula de ARN que tiene una secuencia en donde cada desoxirribonucleótido A, G o C de SEQ ID NO: 3 ha sido reemplazado por el correspondiente ribonucleótido A, G o C, y cada desoxirribonucleótido T ha sido reemplazado por un ribonucleótido U.

En la presente memoria, también se describe un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos al menos aproximadamente un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (FIG-ROS (S)); (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (FIGOS (XL)); (c) una secuencia de nucleótidos que comprende al menos seis nucleótidos contiguos que abarcan la unión de fusión de un polinucleótido de fusión FIG-ROS (S) (p. ej., AAGTAC), una secuencia de nucleótidos que comprende al menos seis nucleótidos contiguos que abarcan la unión de fusión de un polinucleótido de fusión FIG-ROS (XL) (p. ej., AAGctg); (d) una secuencia de nucleótidos que codifica al menos seis restos de aminoácidos contiguos que abarcan la unión de fusión de un polipéptido de fusión FIG-ROS (S) (p. ej., AGSTLP); (e) una secuencia de nucleótidos que codifica al menos seis restos de aminoácidos contiguos que abarca la unión de fusión de un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL) (p. ej., LQAGVP); y (f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de (a), (b), (c), (d) o (e).

Usando la información proporcionada en la presente memoria, tal como las secuencias de nucleótidos expuestas en las SEQ ID NO: 1, 3 y 16, se puede obtener una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria usando procedimientos de clonación y de detección convencionales, tales como los de clonación de ADNc usando ARNm como material de partida. El gen de fusión también puede identificarse en bibliotecas de ADNc en otros cánceres humanos en los que tiene lugar la translocación de FIG-ROS, o en donde una eliminación o translocación alternativa produce la expresión de una ROS-quinasa truncada carente del dominio extracelular, y puede carecer además del dominio transmembrana de la ROS quinasa de tipo silvestre.

La secuencia nucleotídica determinada de los genes de translocación de la FIG-ROS codifica el polipéptido de fusión FIG-ROS (S), el polipéptido de fusión FIG-ROS (L) y el polipéptido de fusión FIG-ROS (XL). Los polinucleótidos de fusión FIG-ROS comprenden la parte de la secuencia de nucleótidos de la FIG de tipo silvestre que codifica el extremo N-terminal de dicha proteína con la parte de la secuencia de nucleótidos de ROS de tipo silvestre que codifica el dominio quinasa de esa proteína.

En la presente memoria, también se describe la forma madura de las proteínas de fusión FIG-ROS. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas segregadas por células de mamífero tienen una señal o secuencia secretora líder que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena proteica en crecimiento a través del retículo endoplasmático rugoso. La mayoría de las células de mamífero e incluso las células de insecto escinden proteínas secretadas con la misma especificidad. Sin embargo, en algunos casos, la escisión de una proteína secretada no es enteramente uniforme, lo que produce dos o más especies maduras sobre la proteína. Además, se sabe desde hace mucho tiempo que la especificidad de la escisión de una proteína segregada se determina en última instancia por la estructura primaria de la proteína completa, es decir, es inherente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por lo tanto, en la presente memoria, se describen secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de fusión FIG-ROS (S) maduro que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 con restos de ácido nucleico adicionales situados en 5' con respecto a los restos terminales 5' de SEQ ID NO. 3, e incluye la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión FIG-ROS (S) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 con restos de aminoácidos adicionales situados N-terminalmente con respecto al resto N-terminal de SEQ ID NO. 4. También se describen en la presente memoria secuencias de

nucleótidos que codifican un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL) maduro que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16 con restos de ácido nucleico adicionales situados 5' con respecto a los restos terminales de 5' de SEQ ID NO. 16, e incluye la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 con restos de aminoácidos adicionales situados N-terminalmente con respecto al resto N-terminal de SEQ ID NO. 17.

Como se indicó, los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, o en forma de ADN, incluyendo, p. ej., ADNc y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN o ARN monocatenario puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena sentido, o puede ser la cadena no codificante, también denominada cadena antisentido.

Los polinucleótidos aislados descrito en la presente memoria son moléculas de ácido nucleico, ADN o ARN, que han sido retiradas de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente descripción. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células hospedadoras heterólogas o moléculas de ADN purificadas (parcial o esencialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN descritas en la presente memoria. Las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente memoria incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente.

Los polinucleótidos aislados descritos en la presente memoria incluyen las moléculas de ácido nucleico que tienen las secuencias expuestas en las moléculas de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1,3 y 16, que comprenden la secuencia codificante de las proteínas de fusión FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) y FIG-ROS (XL) que comprenden una secuencia diferente de las descritas anteriormente, pero que, debido a la degeneración del código genético, sigue siendo un polipéptido ROS mutante descrito en la presente memoria. El código genético es bien conocido en la técnica, por lo tanto, sería rutinario para un experto en la técnica generar dichas variantes degeneradas.

También se describe en la presente memoria un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de fusión FIG-ROS que comprende la secuencia de nucleótidos de translocación FIG-ROS contenida en los clones de ADNc descritos anteriormente. En algunas realizaciones, dicha molécula de ácido nucleico codificará el polipéptido de fusión FIG-ROS (S) maduro, el polipéptido de fusión FIG-ROS (L) maduro o el polipéptido de fusión FIG-ROS (XL) maduro. En otra realización, una secuencia de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal de FIG y el dominio quinasa de ROS. En una realización, el polipéptido que comprende el dominio quinasa de ROS comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. En otra realización, la secuencia de aminoácidos N-terminal de FIG y el dominio quinasa de ROS están codificadas por las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 16.

En la presente memoria, se describen polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de nucleótidos que tienen una secuencia complementaria a uno de los polipéptidos ROS mutantes descrito en la presente memoria. Dichas moléculas aisladas, en particular, moléculas de ADN, son útiles como sondas para la cartografía de genes, por hibridación *in situ* con cromosomas y para detectar la expresión de la proteína de fusión FIG-ROS o el polipéptido ROS quinasa truncado en tejido humano, p. ej., mediante análisis de transferencia Northern.

También se describen en la presente memoria fragmentos de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente memoria. Por un fragmento de un polinucleótido FIG-ROS aislado o polinucleótido ROS truncado descrito en la presente memoria se entiende fragmentos de al menos aproximadamente 15 nucleótidos, o al menos aproximadamente 20 nucleótidos, aún más preferiblemente, al menos aproximadamente 30 nucleótidos, o al menos aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, que son útiles como sondas de diagnóstico y cebadores como se describe en la presente memoria. Como es evidente, también son útiles fragmentos mayores de aproximadamente 50 a 1.500 nucleótidos de longitud según la presente descripción, así como fragmentos que corresponden a la mayoría, si no a la totalidad, de la secuencia de nucleótidos de FIG-ROS de los ADNc que tienen secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1, 3 o 16. Por "un fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud", por ejemplo, se entiende fragmentos que incluyen 20 o más bases contiguas de las respectivas secuencias de nucleótidos de las que se obtienen los fragmentos.

La generación de dichos fragmentos de ADN es rutinaria para el experto en la técnica, y puede realizarse, a modo de ejemplo, mediante escisión por endonucleasa de restricción o cizalla mediante sonicación de ADN obtenible del clon de ADNc descrito en la presente memoria o sintetizarse según la secuencia descrita en la presente memoria. Como alternativa, dichos fragmentos se pueden generar directamente de manera sintética.

En la presente memoria, se describe además un polinucleótido aislado (p. ej., una sonda nucleotídica) que se hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido de ROS quinasa mutante descrito en la presente memoria, tal como un polinucleótido de fusión FIG-ROS). La expresión "condiciones rigurosas" con respecto a la secuencia de nucleótidos o las condiciones de hibridación de la sonda nucleotídica es la "rigurosidad" que se produce en intervalo de aproximadamente una T_f inferior a 5 °C (es decir, 5 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_f) de la sonda o secuencia) a aproximadamente 20 °C a 25 °C por debajo de la T_f . Las condiciones rigurosas típicas son: incubación

5 durante la noche a 42 °C en una solución que comprende: formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cizallado, seguido por el lavado de los filtros en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C. Como comprenderán los expertos en la técnica, la rigurosidad de la hibridación puede alterarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos idénticas o relacionadas.

10 Por sonda de polinucleótido o nucleótidos que se hibrida con un polinucleótido de referencia (p. ej., un polinucleótido de fusión FIG-ROS (S)) se entiende que la sonda de polinucleótido o de nucleótidos (p. ej., ADN, ARN o híbrido de ADN-ARN) se hibrida a lo largo de toda la longitud del polinucleótido de referencia o se hibrida con una parte del polinucleótido de referencia que es al menos aproximadamente 15 nucleótidos (nt), o al menos aproximadamente 20 nt, o al menos aproximadamente 30 nt, o aproximadamente 30-70 nt del polinucleótido de referencia. Estas sondas de nucleótidos son útiles como sondas y cebadores de diagnóstico (p. ej., para la PCR) como se analiza en la presente memoria.

15 Como es evidente, los polinucleótidos que se hibridan con una parte mayor del polinucleótido de referencia (p. ej., el polinucleótido de fusión FIG-ROS (S) que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, por ejemplo, una parte de 50 a 750 nt de longitud, o incluso con toda la longitud del polinucleótido de referencia, son útiles como sondas según la presente descripción, así como los polinucleótidos que corresponden a la mayoría, si no a la totalidad, de la secuencia de nucleótidos de los ADNc descritos en la presente memoria o las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1 o 3.

20 Como se emplea en la presente memoria, por "una parte de un polinucleótido de 'al menos 15 nucleótidos' de longitud", por ejemplo, se entiende 15 o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de referencia. Como se ha indicado, dichas partes son útiles como sondas de nucleótidos para su uso en el diagnóstico según técnicas convencionales de hibridación de ADN o para su uso como cebadores para la amplificación de una secuencia diana mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se describe por ejemplo, en "MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL", 2ª edición, Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Como es evidente, un polinucleótido que se hibrida solo con una secuencia poli A (tal como el tramo poli(A) del extremo 3' de las secuencias de FIG-ROS (p.ej., SEQ ID NO: 1 o 3) o a un tramo complementario de restos de T (o U), no se incluiría en un polinucleótido descrito en la presente memoria usado para hibridarse con una parte de un ácido nucleico descrito en la presente memoria, ya que dicho polinucleótido se hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico que contuviera un tramo poli (A) o el complemento del mismo (p. ej., prácticamente cualquier clon de ADNc bicatenario).

35 Como se indica, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria, que codifican un polipéptido ROS quinasa mutante descrito en la presente memoria, pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas que codifican la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro, por sí mismas; la secuencia codificante para el polipéptido maduro y secuencias adicionales, tales como las que codifican la secuencia líder o secretora, tal como una secuencia pre-, o pro- o pre-pro-proteína; la secuencia codificante del polipéptido maduro, con o sin las secuencias codificantes adicionales mencionadas anteriormente, junto con secuencias adicionales no codificantes, que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, intrones y secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como las secuencias transcritas, no traducidas que desempeñan un papel en la transcripción, el procesamiento del ARNm, incluyendo las señales de corte y empalme, y poliadenilación, por ejemplo - unión a ribosomas y estabilidad del ARNm; una secuencia codificante adicional que codifica aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales.

45 Por lo tanto, la secuencia que codifica el polipéptido puede fusionarse a una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones de este aspecto descrito en la presente memoria, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (Qiagen, Inc.), entre otros, muchos de los cuales se encuentran disponibles en el mercado. Según lo descrito en Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. El marcador "HA" es otro péptido útil para la purificación que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe, que ha sido descrita por Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984). Como se describe a continuación, otras de dichas proteínas de fusión incluyen el polipéptido de fusión FIG-ROS fusionado a Fc en el extremo N- o C-terminal.

55 En la presente memoria, también se describen variantes de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria, que codifican partes, análogos o derivados de un polipéptido de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS quinasa truncado descrito en la presente memoria. Las variantes pueden darse de manera natural, tal como una variante alélica natural. Por "variante alélica" se entiende una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo. Véase, por ejemplo, GENES II, Fewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985). Las variantes de origen no natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica.

60 Dichas variantes incluyen las producidas por sustituciones, eliminaciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, eliminaciones o adiciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes pueden alterarse en

regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, eliminaciones o adiciones conservativas o no conservativas de aminoácidos. Algunas alteraciones incluidas son sustituciones, adiciones y eliminaciones silenciosas, que no alteran las propiedades ni las actividades (p. ej., actividad quinasa) de los polipéptidos de fusión FIG-ROS descritos en la presente memoria.

- 5 Otras realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos al menos un 90 % idéntica. En algunas realizaciones, el nucleótido es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a un polinucleótido ROS mutante descrito en la presente memoria (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de fusión FIG-ROS (S) que tiene la secuencia de aminoácidos completa establecida en SEQ ID NO: 4, o una secuencia de nucleótidos que codifica el extremo N-terminal de FIG y el dominio quinasa de ROS, o un nucleótido complementario a dichas secuencias ilustrativas.

10 Por polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica un polipéptido ROS mutante se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica el polipéptido ROS mutante. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos de la secuencia de referencia puede eliminarse o sustituirse con otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta el 5 % de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden darse en las posiciones del extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre nucleótidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

25 Como una cuestión práctica, se puede determinar si cualquier molécula de ácido nucleico en particular es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica, por ejemplo, a las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1 y 3, o a la secuencia de nucleótidos de los clones de ADNc descritos en la presente memoria convencionalmente usando programas informáticos conocidos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una determinada secuencia es, por ejemplo, un 95 % idéntica a una secuencia de polinucleótido de fusión FIG-ROS descrita en la presente memoria, los parámetros se establecen, como es evidente, de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud total de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permitan huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de restos de nucleótidos en la secuencia de referencia.

35 También se describen en la presente memoria moléculas de ácido nucleico al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NO: 1 o 3, o nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 2, 4, D o E, independientemente de si codifican un polipéptido que tiene actividad de ROS quinasa. Esto se debe a que incluso cuando una determinada molécula de ácido nucleico no codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad de ROS quinasa, un experto en la técnica todavía sabría usar la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, como una sonda de hibridación o un cebador de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria que no codifican un polipéptido que tiene quinasa incluyen, entre otros, (1) aislar el gen de translocación de FIG-ROS o sus variantes alélicas en una biblioteca de ADNc; (2) hibridación *in situ* (p. ej., "FISH") a las dispersiones cromosómicas en metástasis para proporcionar una localización cromosómica precisa del gen de translocación de FIG-ROS, como se describe en Verma *et al.*, "HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES", Pergamon Press, Nueva York (1988); y el análisis de transferencia Northern para detectar la expresión de ARNm de la proteína de fusión FIG-ROS en tejidos específicos.

50 Además, en la presente memoria se describen moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias al menos un 95 % idénticas a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS (p. ej., FIG-ROS (S)) o ROS truncado carente de un dominio extracelular de ROS quinasa de tipo silvestre o que carece tanto del dominio extracelular como del dominio transmembrana de la ROS quinasa de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS codificado y/o ROS truncado tienen actividad de quinasa. Dicha actividad puede ser similar, pero no necesariamente idéntica, a la actividad de la proteína de fusión FIG-ROS descrita en la presente memoria (ya sea la proteína de longitud completa, la proteína madura o un fragmento de proteína que conserve la actividad quinasa), medida en un determinado ensayo biológico. Por ejemplo, la actividad quinasa de ROS se puede examinar determinando su capacidad para fosforilar uno o más sustratos peptídicos que contienen tirosina, por ejemplo, "péptido relacionado con Src" (RRLIEDAEYAARG), que es un sustrato para muchas tirosina quinasa receptoras y no receptoras.

60 Debido a la degeneración del código genético, los expertos en la técnica reconocerán inmediatamente que un gran número de moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de los ADNc descritos en la presente memoria, a las secuencias de

ácido nucleico expuestas en SEQ ID NO: 1, 3 o 16 o a secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 2, 4 o 17 codificarán un polipéptido de fusión que tiene actividad de ROS quinasa. De hecho, puesto que todas las variantes degeneradas de estas secuencias de nucleótidos codifican el mismo polipéptido, esto será evidente para el experto incluso sin realizar el ensayo de comparación descrito anteriormente. Se reconocerá además en la técnica que, para dichas moléculas de ácido nucleico que no son variantes degeneradas, un número razonable codificará también un polipéptido que conserva la actividad de ROS quinasa. Esto se debe a que el experto en la técnica es plenamente consciente de las sustituciones de aminoácidos que con menor o ninguna probabilidad afectarán significativamente la función de la proteína (p. ej., reemplazando un aminoácido alifático con un segundo aminoácido alifático). Por ejemplo, en Bowie *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", *Science* 247:1306-1310 (1990), se describen dos enfoques principales sobre cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio. Los expertos en la técnica familiarizados con dichas técnicas también aprecian qué cambios de aminoácidos son susceptibles de ser permisivos en una cierta posición de la proteína. Por ejemplo, la mayoría de los restos de aminoácidos enterrados requiere cadenas laterales no polares, mientras que pocas características de las cadenas laterales superficiales se conservan en general. Otras de dichas sustituciones fenotípicamente silenciosas se describen en Bowie *et al.*, *supra*, y las referencias citadas en la misma.

Los métodos para la secuenciación del ADN que son bien conocidos y, en general, se encuentran disponibles en la técnica pueden usarse para poner en práctica cualquier realización de los polinucleótidos descrita en la presente memoria. Los métodos pueden emplear enzimas tales como el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I, SEQUENASE® (US Biochemical Corp., Cleveland, Ohio), Taq polimerasa (Invitrogen), polimerasa T7 termoestable (Amersham, Chicago, Ill) o combinaciones de polimerasas recombinantes y exonucleasas de corrección tales como el sistema de amplificación ELONGASE comercializado por Gibco BRL (Gaithersburg, Md.). El proceso se puede automatizar con máquinas tales como Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, Nev.), el ciclador térmico de Peltier (PTC200; MJ Research, Watertown, Mass.) y el secuenciador de ADN ABI 377 (Applied Biosystems).

Las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido ROS mutante descrito en la presente memoria pueden extenderse utilizando una secuencia de nucleótidos parcial y empleando diversos métodos conocidos en la técnica para detectar secuencias cadena arriba tales como elementos promotores y reguladores. Por ejemplo, un método que puede emplearse, la PCR de "sitio de restricción", usa cebadores universales para recuperar una secuencia desconocida adyacente a un locus conocido ((Sarkar, G., *PCR Methods Applic.* 2: 318-322 (1993)). En particular, el ADN genómico se amplifica en primer lugar en presencia de cebador a secuencia enlazador y un cebador específico para la región conocida. Los cebadores ilustrativos son los descritos en el Ejemplo 4 de la presente memoria. Las secuencias amplificadas se someten entonces a una segunda serie de PCR con el mismo cebador enlazador y otro cebador específico interno al primero. Los productos de cada serie de PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada y se secuencian usando transcriptasa inversa.

También se puede usar la PCR inversa para amplificar o extender secuencias usando cebadores divergentes basados en una región conocida (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16:8186 (1988)). Los cebadores pueden diseñarse usando el software de análisis de cebadores OLIGO 4.06 (National Biosciences Inc., Plymouth, Minnesota), u otro programa apropiado, para tener una longitud de 22-30 nucleótidos, tener un contenido de GC del 50 % o superior e hibridarse con la secuencia diana a temperaturas de aproximadamente 68-72 °C. El método usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento se circulariza luego mediante ligación intramolecular y se usa como molde de PCR.

Otro método que se puede usar es la PCR de captura que implica la amplificación por PCR de los fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en ADN de cromosomas artificiales humanos y de levaduras (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic.* 1:111-119 (1991)). En este método, también se pueden usar múltiples digestiones y ligaciones de enzimas de restricción para colocar una secuencia bicatenaria modificada genéticamente en una parte desconocida de la molécula de ADN antes de realizar la PCR. Otro método que puede usarse para recuperar secuencias desconocidas es el descrito en Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060 (1991)). Además, se pueden usar PCR, cebadores anidados y bibliotecas PROMOTERFINDER® para recorrer el ADN genómico (Clontech, Palo Alto, Calif.). Este proceso evita la necesidad de explorar bibliotecas y es útil para encontrar uniones intrón/exón.

Cuando se exploran ADNc de longitud completa, se pueden usar bibliotecas que han sido seleccionadas en tamaño para incluir ADNc mayores o bibliotecas de cebado aleatorio, que contienen más secuencias que contienen las regiones 5' de genes. Una biblioteca cebada al azar es útil para situaciones en las que una biblioteca oligo d(T) no produce un ADNc de longitud completa. Las bibliotecas genómicas pueden ser útiles para la extensión de la secuencia en las regiones reguladoras 5' y 3' no transcritas.

Pueden usarse sistemas de electroforesis capilar, que se encuentran disponibles en el mercado, para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de los productos de secuenciación o PCR. En particular, la secuenciación capilar puede emplear polímeros fluidos para la separación electroforética, cuatro colorantes fluorescentes diferentes (uno por cada nucleótido) que son activados por láser y la detección de las longitudes de onda emitidas por una cámara de dispositivo de carga acoplada. La intensidad de salida/luz se puede convertir en señal eléctrica usando el software apropiado (p. ej., GENOTYPER™ y SEQUENCE NAVIGATOR™, Applied

Biosystems), y todo el proceso desde la carga de muestras hasta el análisis por ordenador y la visualización electrónica de datos se puede controlar por ordenador. La electroforesis capilar es útil para la secuenciación de pequeños fragmentos de ADN que podrían estar presentes en cantidades limitadas en una determinada muestra.

5 En la presente memoria, se describen vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido aislado descrito en la presente memoria, células hospedadoras que se manipulan genéticamente con los vectores recombinantes y la producción de polipéptidos FIG-ROS recombinantes o fragmentos de los mismos mediante técnicas recombinantes.

10 Las construcciones recombinantes pueden introducirse en células hospedadoras usando técnicas bien conocidas tales como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, plásmido, vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser competentes en la replicación o tener una replicación defectuosa. En este último caso, la propagación vírica se producirá, en general, solo en células hospedadoras complementarias.

15 Los polinucleótidos pueden unirse a un vector que contenga un marcador seleccionable para la propagación en un hospedador. En general, se introduce un vector de plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato cálcico, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse *in vitro* usando una estirpe celular de empaquetamiento apropiada y después transducirse en células hospedadoras. En la presente memoria, se describen vectores que comprenden regiones de control que actúan en *cis* en el polinucleótido de interés. Los factores de acción en *trans* adecuados pueden ser suministrados por el hospedador, suministrarse por un vector complementario o suministrarse por el propio vector tras la introducción en el hospedador. En ciertas realizaciones a este sentido, los vectores proporcionan una expresión específica, que puede ser inducible y/o específica del tipo de célula (p. ej., inducible por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como temperatura y aditivos nutrientes).

20 La inserción de ADN que comprende un polinucleótido FIG-ROS o un polinucleótido ROS truncado descrito en la presente memoria se debe unir operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL lambda del fago, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40, y promotores de las LTR retrovíricas, por nombrar algunos. El experto en la técnica conoce otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para la iniciación y la terminación de la transcripción, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La parte codificante de las transcripciones maduras expresadas por las construcciones puede incluir una traducción que se inicia al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado adecuadamente al final del polipéptido que se va a traducir.

30 Como se indica, los vectores de expresión pueden incluir al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen resistencia a la dihidrofolato reductasa o neomicina para el cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a la tetraciclina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas tales como células de levadura; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como células CHO, COS y de melanoma Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivo y las condiciones apropiados para las células hospedadoras descritas anteriormente son conocidos en la técnica.

40 Los vectores no limitantes para su uso en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, disponibles en Pharmacia. Los vectores eucariotas no limitantes incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL, disponibles en Pharmacia. Otros vectores adecuados serán muy evidentes para el experto en la técnica.

45 Los promotores bacterianos no limitantes adecuados para su uso en la presente descripción incluyen los promotores lacZ y lacZ de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor gpt, los promotores PR y PL lambda y el promotor trp. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor temprano inmediato del CMV, el promotor de timidina quinasa del HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de las LTR retrovíricas, tales como los del pvirus del sarcoma de Rous (RSV), y los promotores de metalotioneína, tales como el promotor de la metalotioneína I de ratón.

50 En la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, se puede usar una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como el factor alfa, la alcohol oxidasa y la PGH. Para las revisiones, véase Ausubel *et al* (1989) "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., y Grant *et al*, *Methods Enzymol* 153: 516-544 (1997).

55 La introducción de la construcción en la célula hospedadora puede verse afectada por la transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al*, "BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY" (1986).

La transcripción del ADN que codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores

son elementos de ADN que actúan en *cis*, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan para aumentar la actividad de transcripción de un promotor en un tipo de célula hospedadora dado. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador de SV40, que está situado en el lado tardío del origen de replicación en los pares de bases 100 a 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplasmático, en el espacio periplasmático o en el entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción apropiadas al polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

El polipéptido puede expresarse en una forma modificada, tal como una proteína de fusión (p. ej., una fusión GST), y puede incluir no solo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, en particular, aminoácidos cargados, al extremo N-terminal del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula hospedadora, durante la purificación o durante la manipulación y el almacenamiento subsiguientes. Además, se pueden añadir fracciones peptídicas al polipéptido para facilitar la purificación. Dichas regiones se pueden eliminar antes de la preparación final del polipéptido. La adición de fracciones peptídicas a polipéptidos para generar secreción o excreción, para mejorar la estabilidad y facilitar la purificación, entre otros, son técnicas conocidas y rutinarias en la técnica.

En un ejemplo no limitante, un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria puede comprender una región heteróloga de una inmunoglobulina que es útil para solubilizar proteínas. Por ejemplo, la patente europea EP-A-O 464 533 (homólogo canadiense 2045869) describe proteínas de fusión que comprenden diversas partes de región constante de moléculas de inmunoglobina junto con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc de una proteína de fusión es completamente ventajosa para su uso en terapia y diagnóstico y, por lo tanto, da lugar, por ejemplo, a propiedades farmacocinéticas mejoradas (patente europea EP-A 0232 262). Por otra parte, para algunos usos, sería deseable poder eliminar la parte Fc tras la expresión, detección y purificación de la proteína de fusión de la manera ventajosa descrita. Este es el caso cuando la parte Fc demuestra ser un obstáculo para el uso en terapia y diagnóstico, por ejemplo, cuando la proteína de fusión se va a usar como antígeno para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, se han fusionado proteínas humanas, tales como, hIL-5 con partes Fc con el propósito de ensayos de rastreo de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5. Véase Bennett *et al.*, *Journal of Molecular Recognition* 8: 52-58 (1995) y Johanson *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry* 270(16): 9459-9471 (1995).

Los polipéptidos FIG-ROS pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos que incluyen sulfato de amonio o precipitación con etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. En algunas realizaciones, se emplea cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación. Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen productos purificados de manera natural, productos de procedimientos sintéticos químicos y productos producidos por técnicas recombinantes desde un hospedador procarionota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden estar glicosilados o pueden no estar glicosilados. Además, los polipéptidos descritos en la presente memoria también pueden incluir un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos, como resultado de procesos mediados por el hospedador.

Por consiguiente, en la presente memoria, también se describe un método de producción de un polipéptido de fusión FIG-ROS recombinante mediante el cultivo de una célula hospedadora recombinante (como se describió anteriormente) en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de fusión y la recuperación del polipéptido. Las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento de células hospedadoras y la expresión de polipéptidos recombinantes a partir de dichas células son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY", Ausubel FM *et al.*, eds., Volumen 2, Capítulo 16, Wiley Interscience.

Se describe además en la presente memoria un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS. En algunas realizaciones, el agente de unión se une específicamente a una unión de fusión entre una parte FIG y una parte ROS en dicho polipéptido de fusión FIG-ROS. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión FIG-ROS es un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), un polipéptido de fusión FIG-ROS (L) o un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL).

En algunas realizaciones, el agente de unión está unido a un marcador detectable. Por "marcador detectable" con respecto a un polipéptido, polinucleótido o agente de unión descrito en la presente memoria significa una modificación química, biológica o de otro tipo del o en el polipéptido, polinucleótido o agente de unión, incluyendo, pero no se limitan a, fluorescencia, masa, resto, colorante, radioisótopo, marcador o modificaciones de marcador, etc., mediante las que se puede detectar la presencia de la molécula de interés. El marcador detectable puede estar unido al polipéptido, polinucleótido o agente de unión mediante un enlace químico covalente o no covalente.

En la presente memoria, se describen también agentes de unión tales como anticuerpos o péptidos AQUA, o fracciones de unión de los mismos, que se unen específicamente a los polipéptidos de fusión FIG-ROS (p. ej., FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) o FIG-ROS (XL) descritos en la presente memoria). Por "que se unen específicamente" o "se une específicamente" se entiende que un agente de unión descrito en la presente memoria (p. ej., un anticuerpo o péptido AQUA) interactúa con su molécula diana (p. ej., un polipéptido de fusión FIG-ROS), donde la interacción es dependiente de la presencia de una determinada estructura (es decir, el determinante antigénico o epítopo) sobre la proteína; en otras palabras, el reactivo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a todas las proteínas en general. Por "fragmento de unión del mismo" se entiende un fragmento o una parte de un reactivo de unión que se une específicamente a la molécula diana (p. ej., un fragmento Fab de un anticuerpo). Un agente de unión que se une específicamente a la molécula diana se puede denominar agente de unión específico de la diana. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido FIG-ROS (L) puede denominarse anticuerpo específico de FIG-ROS (L). En algunas realizaciones, un agente de unión tiene una afinidad de unión (K_D) hacia su molécula diana (p. ej., un polipéptido de fusión FIG-ROS) de 1×10^{-6} M o inferior. En algunas realizaciones, un agente de unión se une a su molécula diana con una K_D de 1×10^{-7} M o inferior, o una K_D de 1×10^{-8} M o inferior, o una K_D de 1×10^{-9} M o inferior, o una K_D de 1×10^{-10} M o inferior, de una K_D de 1×10^{-11} M o inferior, de una K_D de 1×10^{-12} M o inferior. En ciertas realizaciones, la K_D de un agente de unión por su molécula diana es de 1 pM a 500 pM, o de 500 pM a 1 μM, o de 1 μM a 100 nM, o de 100 nM a 10 nM. Los ejemplos no limitantes de una molécula diana a la que se une específicamente un agente de unión para incluir el polipéptido de fusión FIG-ROS (L), el polipéptido de fusión FIG-ROS (S) y fragmentos de los mismos, particularmente aquellos fragmentos que incluyen la unión entre la parte FIG y la parte ROS de un polipéptido de fusión FIG-ROS.

El agente de unión descrito en la presente memoria, incluyendo los útiles en la práctica de los métodos descritos, incluyen, entre otros, anticuerpos específicos de polipéptido de fusión FIG-ROS y péptidos AQUA (péptidos marcados con isótopos pesados) correspondientes a y adecuados para la detección y cuantificación de la expresión de polipéptido de fusión FIG-ROS en una muestra biológica. Por lo tanto, un "agente de unión específica del polipéptido de fusión FIG-ROS" es cualquier reactivo, agente biológico o químico, capaz de unirse específicamente a, detectar y/o cuantificar la presencia/el nivel de polipéptido de fusión FIG-ROS expresado en una muestra biológica. La expresión incluye, pero no se limita a, los anticuerpos y reactivos peptídicos AQUA que se tratan a continuación, y agentes de unión equivalentes.

En algunas realizaciones, el agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS es un anticuerpo (es decir, un anticuerpo específico del polipéptido de fusión FIG-ROS). En algunas realizaciones, un anticuerpo específico del polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria es un anticuerpo aislado o anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria (p. ej., FIG-ROS (L), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (S)), pero no se une sustancialmente a la FIG de tipo silvestre ni a ROS de tipo silvestre. También son útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria otros reactivos tales como anticuerpos específicos del epítopo que se unen específicamente a un epítopo en los dominios extracelulares o quinasa de la secuencia de proteína ROS de tipo silvestre (cuyos dominios no están presentes en la ROS quinasa truncada descrita en la presente memoria), y son, por lo tanto, capaces de detectar la presencia (o ausencia) de la ROS de tipo silvestre en una muestra.

Los anticuerpos específicos de los polipéptidos de fusión FIG-ROS humanos también pueden unirse a secuencias de péptidos epitópicos altamente homólogos y equivalentes en otras especies de mamífero, por ejemplo, murina o de conejo, y viceversa. Los anticuerpos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen (a) anticuerpos monoclonales; (b) anticuerpos policlonales purificados que se unen específicamente al polipéptido diana (p. ej., la unión de fusión del polipéptido de fusión FIG-ROS); (c) anticuerpos como los descritos en (a)-(b) anteriores que se unen a epítopos o sitios de fosforilación equivalentes y altamente homólogos en otras especies no humanas (p. ej., ratón, rata); y (d) fragmentos de (a)-(c) anteriores que se unen al antígeno (o más preferiblemente el epítopo) unidos por los anticuerpos ilustrativos descritos en la presente memoria.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se refiere a todos los tipos de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, incluyendo fragmentos de unión de las mismas (es decir, fragmentos de un anticuerpo que son capaces de unirse específicamente a la molécula diana del anticuerpo, tales como fragmentos F_{ab} y F(ab')₂), así como anticuerpos recombinantes, humanizados, policlonales y monoclonales y/o fragmentos de unión de los mismos. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden derivarse de cualquier especie de animal, tal como de un mamífero. Los anticuerpos naturales ilustrativos no limitantes incluyen anticuerpos derivados de seres humanos, pollos, cabras y roedores (p. ej., ratas, ratones, hámsteres y conejos), incluyendo roedores transgénicos manipulados genéticamente para producir anticuerpos humanos (véase, p. ej., Lonberg *et al.*, documento WO93/12227; patente de EE.UU. n.º 5.545.806; y Kucherlapati, *et al.*, documento WO91/10741; de EE.UU. n.º 6.150.584). Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden ser anticuerpos quiméricos. Véase, p. ej., M. Walker *et al.*, *Molec. Immunol.* 26: 403-11 (1989); Morrisison *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 81: 6851 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604 (1984)). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes producidos según los métodos descritos en la patente de EE.UU. n.º 4.474.893 (Lectura) o patente de EE.UU. n.º 4.816.567 (Cabilly *et al.*) Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos específicos construidos químicamente según el método descrito en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980 (Segel *et al.*)

Los anticuerpos naturales son los anticuerpos producidos por un animal hospedador; sin embargo, también se

contemplan anticuerpos genéticamente modificados en donde la secuencia de aminoácidos ha variado de la de un anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante para dicha aplicación, no es necesario limitarse a las secuencias de aminoácidos encontradas en anticuerpos naturales; los anticuerpos se pueden rediseñar para obtenerse las características deseadas. Las variaciones posibles son muchas, y varían del cambio de solo uno o unos cuantos aminoácidos hasta el rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Los cambios en la región constante, en general, se harán con el fin de mejorar o alterar características tales como la fijación del complemento, la interacción con las membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se harán con el fin de mejorar las características de unión al antígeno. La expresión "anticuerpo humanizado", como se emplea en la presente memoria, se refiere a moléculas de anticuerpo en las que los aminoácidos han sido sustituidos en las regiones de unión no al antígeno con el fin de parecerse más a un anticuerpo humano, manteniendo, al tiempo que conservan la capacidad de unión original. Otros anticuerpos contemplados en concreto son anticuerpos oligoclonales. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "anticuerpos oligoclonales" se refiere a una mezcla predeterminada de distintos anticuerpos monoclonales. Véase, p. ej., la publicación PCT WO 95/20401; las patentes de EE.UU. n.º 5.789.208 y 6.335.163. En una realización, los anticuerpos oligoclonales que consisten en una mezcla predeterminada de anticuerpos contra uno o más epítopos se generan en una única célula. En otras realizaciones, los anticuerpos oligoclonales comprenden una pluralidad de cadenas pesadas capaces de emparejarse con una cadena ligera común para generar anticuerpos con múltiples especificidades (p. ej., publicación PCT WO 04/009618). Los anticuerpos oligoclonales son particularmente útiles cuando se desea dirigir múltiples epítopos sobre una sola molécula diana. En vista de los ensayos y epítopos descritos en la presente memoria, los expertos en la técnica pueden generar o seleccionar anticuerpos o mezclas de anticuerpos que sean aplicables para un fin previsto y la necesidad deseada.

También se incluyen anticuerpos recombinantes en la presente descripción. Estos anticuerpos recombinantes tienen la misma secuencia de aminoácidos que los anticuerpos naturales o tienen secuencias de aminoácidos modificadas de los anticuerpos naturales. Pueden fabricarse en cualquier sistema de expresión, incluyendo sistemas de expresión tanto procariontas como eucariotas o usando métodos de presentación en fagos (véase, p. ej., Dower *et al.*, documento WO91/17271 y McCafferty *et al.*, documento WO92/01047; patente de EE.UU. n.º 5.969.108). Los anticuerpos se pueden diseñar de muchas maneras. Pueden fabricarse como anticuerpos monocatenarios (incluyendo productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños o SMIPs™), fragmentos Fab y F(ab')₂, etc. Los anticuerpos pueden ser humanizados, quimerizados, desimmunizados o totalmente humanos. Numerosas publicaciones exponen los muchos tipos de anticuerpos y los métodos de ingeniería de dichos anticuerpos. Por ejemplo, véanse las patentes de EE.UU. n.º 6.355.245; 6.180.370; 5.693.762; 6.407.213; 6.548.640; 5.565.332; 5.225.539; 6.103.889; y 5.260.203. Los anticuerpos genéticamente modificados descritos en la presente memoria pueden ser funcionalmente equivalentes a los anticuerpos naturales mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados descritos en la presente memoria proporcionan unas mejores estabilidad y/o eficacia terapéutica. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos modificados incluyen aquellos con sustituciones conservativas de restos de aminoácidos y una o más eliminaciones o adiciones de aminoácidos que no modifican de forma significativa la utilidad de unión al antígeno. Las sustituciones pueden variar desde el cambio o la modificación de uno o más restos de aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, siempre que se mantenga la utilidad terapéutica. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden modificarse después de la traducción (p. ej., acetilación y/o fosforilación) o pueden modificarse sintéticamente (p. ej., la unión de un grupo de marcaje). Los anticuerpos con regiones Fc o constantes modificadas por ingeniería genética o variantes pueden ser útiles en la modulación de funciones efectoras tales como, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del antígeno (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Dichos anticuerpos con regiones Fc o constantes modificadas por ingeniería genética o variantes pueden ser útiles en casos en los que una proteína singulante precursora (Tabla 1) se expresa en tejido normal; los anticuerpos variantes sin función efectora en estos casos pueden generar la respuesta terapéutica deseada sin dañar el tejido normal. Por consiguiente, ciertos aspectos y métodos de la presente descripción se refieren a anticuerpos con funciones efectoras modificadas que comprenden una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos. La expresión "biológicamente activa" se refiere a una proteína que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de una molécula natural. Asimismo, "inmunológicamente activo" se refiere a la capacidad del polipéptido de fusión FIG-ROS natural, recombinante o sintético, o polipéptido ROS truncado, o cualquier oligopéptido del mismo, para inducir una respuesta inmune específica en animales o células apropiados y para unirse con anticuerpos específicos.

También descritas en la presente memoria se encuentran moléculas de anticuerpo con menos de 4 cadenas, incluyendo anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de camélidos y similares, y componentes de un anticuerpo, incluyendo una cadena pesada o una cadena ligera. En algunas realizaciones, una cadena de inmunoglobulina puede comprender en orden de 5' a 3', una región variable y una región constante. La región variable puede comprender tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), con regiones marco conservadas (FR) intercaladas para una estructura FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. También descritas en la presente memoria se encuentran regiones variables, regiones marco conservadas y CDR de cadena pesada o ligera. Un anticuerpo descrito en la presente memoria puede comprender una región constante de cadena pesada que comprende parte o la totalidad de una región CH1, bisagra, región CH2 y CH3.

Un sitio epitópico no limitante de un anticuerpo específico del polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria es un fragmento peptídico que consiste esencialmente en de aproximadamente 11 a 17 aminoácidos de

una secuencia de polipéptido de fusión FIG-ROS humana, fragmento que abarca la unión de fusión entre la parte FIG de la molécula y la parte ROS de la molécula. Se apreciará que se prevén los anticuerpos que se unen específicamente a péptidos/epítomos más cortos o más largos que abarcan la unión de fusión de un polipéptido de fusión FIG-ROS.

- 5 La descripción no se limita al uso de anticuerpos, sino que incluye moléculas equivalentes, tales como dominios de unión a proteínas o aptámeros de ácidos nucleicos, que se unen, de una manera específica de la proteína de fusión o de la proteína truncada, a esencialmente el mismo epítomo al que se une un anticuerpo específico del polipéptido de fusión FIG-ROS o anticuerpo específico del epítomo puntual de truncamiento de ROS en los métodos descritos en la presente memoria. Véase, p. ej., Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604 (1984). Dichos reactivos no anticuerpos
10 equivalentes pueden emplearse adecuadamente en los métodos descritos en la presente memoria que se describen mejor más adelante.

Los anticuerpos policlonales útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria pueden producirse según técnicas convencionales mediante la inmunización de un animal adecuado (p. ej., conejo, cabra, etc.) con un antígeno que abarca un epítomo específico de la proteína de fusión deseada (p. ej., la unión de fusión
15 entre FIG y ROS en el polipéptido de fusión FIG-ROS), recogiendo el suero inmune del animal, y separando los anticuerpos policlonales del suero inmune, y purificando anticuerpos policlonales que tienen la especificidad deseada, según procedimientos conocidos. El antígeno puede ser un antígeno de péptido sintético que comprende la secuencia epitópica deseada, seleccionada y construida según técnicas bien conocidas. Véase, p. ej., "ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL", Capítulo 5, pág. 75-76, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor
20 Laboratory (1988); Czernik, *Methods In Enzymology*, 201: 264-283 (1991); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 21-49 (1962)). Los anticuerpos policlonales producidos según lo descrito en la presente memoria se pueden detectar y asilar como se describe mejor más adelante.

Los anticuerpos monoclonales también pueden emplearse beneficiosamente en los métodos descritos en la presente memoria, y pueden producirse en estirpes celulares de hibridoma según la técnica bien conocida de Kohler
25 y Milstein. *Nature* 265: 495-97 (1975); Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511 (1976); véase, también, "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY", Ausubel *et al.* Eds (1989). Los anticuerpos monoclonales así producidos son altamente específicos, y mejoran la selectividad y especificidad de los métodos de ensayo descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede inyectar una solución que contenga el antígeno apropiado (p. ej., un péptido sintético que comprenda la unión de fusión del polipéptido de fusión FIG-ROS) en un ratón y, después de un
30 tiempo suficiente (según las técnicas convencionales), sacrificarse el ratón sacrificado y obtenerse células de bazo. Las células del bazo se immortalizan después fusionándolas con células de mieloma, normalmente, en presencia de polietilenglicol, para producir células de hibridoma. Pueden producirse hibridomas de fusión de conejo, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.675.063. Las células de hibridoma se cultivan a continuación en un medio de selección adecuado, tal como hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), y se explora el sobrenadante en
35 busca de los anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada, como se describe a continuación. El anticuerpo secretado puede recuperarse del sobrenadante del cultivo de tejidos mediante métodos convencionales tales como precipitación, intercambio iónico o cromatografía de afinidad, o similares.

También pueden producirse fragmentos Fab monoclonales en *Escherichia coli* mediante técnicas recombinantes conocidas por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., W. Huse, *Science* 246: 1275-81 (1989); Mullinax *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.* 87: 8095 (1990). Si se desean anticuerpos monoclonales de un isotipo para una determinada
40 aplicación, se pueden preparar directamente isótopos particulares, seleccionando de la fusión inicial, o prepararse secundariamente, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de isotipo diferente usando la técnica de selección de sib para aislar variantes de cambio de clase (Steplewski, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 8653 (1985); Spira *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 74: 307 (1984)). El sitio de combinación del antígeno del anticuerpo monoclonal se puede clonar mediante PCR y los anticuerpos monocatenarios producidos como anticuerpos recombinantes presentados en fagos o anticuerpos solubles en *E. coli* (véase, p. ej., "ANTIBODY
45 ENGINEERING PROTOCOLS", 1995, Humana Press, Sudhir Paul editor).

Además, la patente de EE.UU. n.º 5.194.392, Geysen (1990) describe un método general de detección o determinación de la secuencia de monómeros (aminoácidos u otros compuestos) que es un equivalente topológico
50 del epítomo (es decir, un "mimotopo"), que es complementario a un paratopo particular (sitio de unión al antígeno) de un anticuerpo de interés. Más en general, este método implica detectar o determinar una secuencia de monómeros que es un equivalente topográfico de un ligando que es complementario al sitio de unión al ligando de un determinado receptor de interés. De manera similar, la patente de EE.UU. n.º 5.480.971, Houghten *et al.* (1996), describe oligopéptidos peralquilados de alquilo C₁-C lineales, y conjuntos y bibliotecas de dichos péptidos, así como
55 métodos de uso de dichos conjuntos de oligopéptidos y bibliotecas para determinar la secuencia de un oligopéptido peralquilado que se une preferiblemente a una molécula aceptora de interés. Así pues, también se pueden fabricar análogos no peptídicos de los péptidos portadores de epítomos descritos en la presente memoria rutinariamente mediante estos métodos.

Los anticuerpos útiles en los métodos descritos en la presente memoria, ya sean policlonales o monoclonales, se pueden rastrear en busca de la especificidad por el epítomo y la proteína de fusión según técnicas convencionales.
60 Véase, p. ej., Czernik *et al.*, *Methods in Enzymology*, 201: 264-283 (1991). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden

rastrear frente a una biblioteca de péptidos por ELISA para garantizar la especificidad tanto por el antígeno deseado como, si se desea, por la reactividad solo con un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria y no con la FIG de tipo silvestre o ROS de tipo silvestre. Los anticuerpos también se pueden analizar por transferencia Western frente a los preparados celulares que contienen la proteína diana para confirmar la reactividad con la única diana deseada y para garantizar una unión apreciable a otras proteínas de fusión que incluyen ROS. La producción, la detección y el uso de anticuerpos específicos de la proteína de fusión son conocidos por los expertos en la técnica, y se han descrito. Véase, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. n.º 20050214301.

Los anticuerpos específicos de los polipéptidos de fusión FIG-ROS útiles en los métodos descritos en la presente memoria pueden presentar cierta reactividad cruzada limitada con epítomos de fusión similares en otras proteínas de fusión o con los epítomos en la FIG de tipo silvestre y ROS de tipo silvestre que forman la unión de fusión. Esto no es inesperado, ya que la mayoría de los anticuerpos presentan algún grado de reactividad cruzada, y los anticuerpos anti-péptido a menudo reaccionan de forma cruzada con epítomos que tienen una elevada homología o identidad con el péptido inmunizante. Véase, p. ej., Czernik, *supra*. La reactividad cruzada con otras proteínas de fusión se caracteriza fácilmente mediante transferencia Western junto a marcadores de peso molecular conocido. Las secuencias de aminoácidos de proteínas de reacción cruzada pueden examinarse para identificar sitios altamente homólogos o idénticos a la secuencia del polipéptido de fusión FIG-ROS a la que se une el anticuerpo. La reactividad cruzada no deseada se puede eliminar por selección negativa usando la purificación del anticuerpo en columnas peptídicas (p. ej., la selección de anticuerpos que se unen bien a la FIG de tipo silvestre y/o a ROS de tipo silvestre).

Los anticuerpos específicos del polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria que son útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente invención son idealmente específicos del polipéptido de fusión humano, pero no se limitan solamente a la unión a la especie humana en sí. La descripción incluye la producción y el uso de anticuerpos que también se unen a epítomos conservados y altamente homólogos o idénticos en otras especies de mamíferos (p. ej., ratón, rata, mono). Las secuencias altamente homólogas o idénticas en otras especies se pueden identificar fácilmente mediante comparaciones de secuencias convencionales, tal como usando BLAST, con las secuencias de polipéptido de fusión FIG-ROS humano descritas en la presente memoria (SEQ ID NO: 1).

Los anticuerpos empleados en los métodos descritos en la presente memoria pueden caracterizarse además mediante y ser validados para su uso en un formato de ensayo particular, por ejemplo, FC, IHC y/o ICC. El uso de anticuerpos específicos del polipéptido de fusión FIG-ROS en dichos métodos se describe más en la presente memoria. Los anticuerpos descritos en la presente memoria, usados solos o en los ensayos descritos a continuación, también pueden conjugarse ventajosamente con colorantes fluorescentes (p. ej., Alexa488, ficoeritrina) o marcadores tales como puntos cuánticos, para su uso en análisis multiparamétricos junto con otros anticuerpos de transducción de señales (fosfo-AKT, fosfo-Erk 1/2) y/o anticuerpos de marcadores celulares (citoqueratina), como se describe más adelante.

En la práctica de los métodos descritos en la presente memoria, la expresión y/o la actividad de FIG de tipo silvestre y/o ROS de tipo silvestre en una muestra biológica dada también puede examinarse ventajosamente usando anticuerpos (ya sea fosfo-específicos o totales) para estas proteínas de tipo silvestre. Por ejemplo, los anticuerpos específicos del sitio de fosforilación del receptor de LCR se encuentran disponibles en el mercado (véase CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Danvers, MA, 2005/06, n.º de catálogo 3151, 3155 y 3154; y Upstate Biotechnology, 2006 n.º de catálogo 06-457). Dichos anticuerpos también pueden producirse según métodos convencionales, como se ha descrito anteriormente. Se publican las secuencias de aminoácidos tanto de FIG como de ROS humanas, al igual que las secuencias de estas proteínas de otras especies.

La detección de la expresión y/o activación de FIG de tipo silvestre y ROS de tipo silvestre, junto con la expresión del polipéptido de fusión FIG-ROS, en una muestra biológica (p. ej., una muestra de tumor) puede proporcionar información sobre si la proteína de fusión sola está generando el tumor, o si ROS de tipo silvestre también está activada e generando el tumor. Dicha información es clínicamente útil para evaluar si dirigir la proteína de fusión o la/s proteína/s de tipo silvestre, o ambas, o si es probable que sea más beneficiosa para inhibir la progresión del tumor, y seleccionar un agente terapéutico apropiado o una combinación de los mismos. Los anticuerpos específicos del dominio extracelular de ROS quinasa de tipo silvestre, que no está presente en la ROS quinasa truncada descrita en la presente memoria, pueden ser particularmente útiles para determinar la presencia/ausencia de la ROS quinasa mutante.

Se entenderá que se pueden usar más de un anticuerpo en la práctica de los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, uno o más anticuerpos específicos del polipéptido de fusión FIG-ROS junto con uno o más anticuerpos específicos de otra quinasa, receptor o sustrato de quinasa que se sospecha que está siendo activado o potencialmente activado en un cáncer en donde se expresa el polipéptido de fusión FIG-ROS se puede emplear simultáneamente para detectar la actividad de otras dichas moléculas de señalización en una muestra biológica que comprende células de dicho cáncer.

Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos de fusión FIG-ROS descritos en la presente memoria y los fragmentos portadores de epítomos de los mismos descritos anteriormente pueden combinarse con partes de otras

moléculas para crear polipéptidos quiméricos. Por ejemplo, un fragmento portador de epítipo de un polipéptido de fusión FIG-ROS puede combinarse con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgG) para facilitar la purificación del polipéptido quimérico y aumentar la semivida *in vivo* del polipéptido quimérico (véanse, p. ej., los ejemplos de proteínas quiméricas CD4-Ig del documento EPA 394.827, Traunecker *et al.*, *Nature* 331: 84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen una estructura dimérica de enlace disulfuro (p. ej., de una parte de IgG) también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas que el polipéptido de fusión FIG-ROS monomérico solo (véase Fountoulakis *et al.*, *J Biochem* 270: 3958-3964(1995)).

En algunas realizaciones, un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS es un péptido marcado con isótopo pesado (es decir, un péptido AQUA). Dicho péptido AQUA puede ser adecuado para la cuantificación absoluta de un polipéptido de fusión FIG-ROS expresado en una muestra biológica. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "péptido marcado con isótopo pesado" se usa indistintamente con "péptido AQUA". Se ha descrito la producción y el uso de péptidos AQUA para la cuantificación absoluta o detección de proteínas (AQUA) en mezclas complejas. Véase el documento WO/03016861, "Absolute Quantification of Proteins and Modified Forms Thereof by Multistage Mass Spectrometry", Gygi *et al.*, y también Gerber *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.* 100:6940-5 (2003) (cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria por referencia, en su totalidad). La expresión "detecta específicamente" con respecto a dicho péptido AQUA significa que el péptido solo detectará y cuantificará polipéptidos y proteínas que contengan la secuencia del péptido AQUA, y no detectará esencialmente polipéptidos ni proteínas que no contengan la secuencia del péptido AQUA.

La metodología de AQUA emplea la introducción de una cantidad conocida de al menos un patrón peptídico marcado con isótopo pesado (que tiene un distintivo único detectable por cromatografía de LC-SRM) en una muestra biológica digerida para determinar, en comparación con el patrón peptídico, la cantidad absoluta de un péptido con la misma secuencia y modificación de la proteína en la muestra biológica. En resumen, la metodología de AQUA tiene dos etapas: la selección y la validación de los patrones internos de péptidos y el desarrollo de métodos; y la implementación usando patrones internos de péptidos validados para detectar y cuantificar una proteína diana en la muestra. El método es una potente técnica para detectar y cuantificar un péptido/una proteína dado dentro de una mezcla biológica compleja, tal como un lisado celular, y puede emplearse, p. ej., para cuantificar el cambio en la fosforilación de la proteína como resultado del tratamiento con fármaco, o para cuantificar las diferencias en el nivel de una proteína en diferentes estados biológicos.

En general, para desarrollar un patrón interno adecuado, se selecciona un péptido en particular (o péptido modificado) de una secuencia de proteína diana basándose en su secuencia de aminoácidos y la proteasa que se va a usar en particular para la digestión. A continuación, se genera el péptido mediante síntesis de péptidos en fase sólida de manera que se sustituye un resto con ese mismo resto que contiene isótopos estables (^{13}C , ^{15}N). El resultado es un péptido que es químicamente idéntico a su homólogo nativo formado por proteólisis, pero que se puede distinguir fácilmente mediante MS a través de un cambio de masa de 7 Da. A continuación, se evalúa el patrón interno de péptido AQUA recién sintetizado mediante LC-MS/MS. Este proceso proporciona información cualitativa sobre la retención de péptidos mediante cromatografía de fase inversa, eficiencia de ionización y fragmentación mediante disociación inducida por colisión. Se seleccionan iones de fragmentos informativos y abundantes para conjuntos de péptidos nativos y patrones internos, y luego se controla específicamente en rápida sucesión en función de la retención cromatográfica para formar un método de control de la reacción seleccionado (LC-SRM) basado en el perfil único del patrón peptídico.

La segunda etapa de la estrategia de AQUA es su implementación para medir la cantidad de proteína o proteína modificada a partir de mezclas complejas. Los lisados de células enteras se fraccionan normalmente mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE, y se escinden regiones del gel compatibles con la migración de proteínas. Este proceso es seguido por una proteólisis en gel en presencia de los péptidos AQUA y el análisis de LC-SRM. (Véase Gerber *et al.*, *supra.*) Los péptidos AQUA se introducen en la mezcla de péptidos complejos obtenida mediante la digestión del lisado celular completo con una enzima proteolítica y se someten a purificación por inmutafinidad como se describió anteriormente. El tiempo de retención y el patrón de fragmentación del péptido nativo formado por digestión (p. ej., tripsinización) es idéntico al del patrón interno de péptido AQUA determinado previamente. Por lo tanto, el análisis de LC-MS/MS usando un experimento de SRM produce la medida altamente específica y sensible tanto del patrón interno como del analito directamente a partir de mezclas de péptidos sumamente complejos.

Dado que se añade una cantidad absoluta del péptido AQUA (p. ej., 250 fmol), se puede usar la proporción de las áreas bajo la curva para determinar los niveles de expresión precisos de una proteína o forma fosforilada de una proteína en el lisado celular original. Además, el patrón interno está presente durante la digestión en gel a medida que se forman péptidos nativos, de manera que la eficacia de extracción de péptidos de los fragmentos de gel, las pérdidas absolutas durante la manipulación de la muestra (incluida la centrifugación al vacío) y la variabilidad durante la introducción en el sistema de LC-MS no afectan a la proporción determinada de las abundancias de péptidos nativos y AQUA.

Se desarrolla un patrón de péptido AQUA para una secuencia conocida previamente identificada mediante el método de IAP-LC-MS/MS dentro de una proteína diana. Si se modifica el sitio, se puede desarrollar un péptido AQUA que incorpore la forma modificada del resto en particular dentro del sitio y se desarrolla un segundo péptido AQUA que incorpora la forma no modificada del resto. De esta manera, los dos patrones pueden usarse para detectar y

cuantificar tanto las formas modificadas como no modificadas del sitio en una muestra biológica.

También se pueden generar patrones internos de péptidos examinando la secuencia de aminoácidos primaria de una proteína y determinando los límites de péptidos producidos por escisión de proteasa. Como alternativa, una proteína puede digerirse realmente con una proteasa y, a continuación, se puede secuenciar un fragmento de péptido en particular producido. Las proteasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, serina proteasas (p. ej., tripsina, hepsina), metalo proteasas (p. ej., PUMP1), quimotripsina, catepsina, pepsina, termolisina, carboxipeptidasas, etc.

Una secuencia peptídica dentro de una proteína diana se selecciona según uno o más criterios para optimizar el uso del péptido como un patrón interno. Preferiblemente, el tamaño del péptido se selecciona para minimizar las posibilidades de que la secuencia peptídica se repita en otras partes de otras proteínas no diana. Así pues, un péptido es preferiblemente al menos aproximadamente 6 aminoácidos. El tamaño del péptido también se optimiza para maximizar la frecuencia de ionización. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el péptido no es más largo de aproximadamente 20 aminoácido. En algunas realizaciones, el péptido tiene entre 7 y 15 aminoácidos de longitud. También se selecciona una secuencia peptídica que no es probable que sea reactivo químicamente durante la espectrometría de masas, por lo que se evitan secuencias que comprenden cisteína, triptófano o metionina.

Una secuencia peptídica que no incluye una región modificada de la región diana puede seleccionarse de manera que el patrón interno del péptido pueda usarse para determinar la cantidad de todas las formas de la proteína. Como alternativa, puede ser deseable un patrón interno de péptido que incluya un aminoácido modificado para detectar y cuantificar solamente la forma modificada de la proteína diana. Los patrones peptídicos para regiones tanto modificadas como no modificadas pueden usarse juntos para determinar la extensión de una modificación en una determinada muestra (es decir, para determinar qué fracción de la cantidad total de proteína está representada por la forma modificada). Por ejemplo, se pueden usar patrones de péptidos para la forma tanto fosforilada como no fosforilada de una proteína que se sabe que está fosforilada en un determinado sitio para cuantificar la cantidad de forma fosforilada en una muestra.

El péptido se marca usando uno o más aminoácidos marcados (es decir, el marcador es una parte real del péptido) o menos preferiblemente, se pueden unir los marcadores después de la síntesis según métodos convencionales. Preferiblemente, el marcador de alteración de masa seleccionado basándose en las siguientes consideraciones: La masa debe ser única para desplazar masas de fragmentos producidas por análisis de MS a regiones del espectro con fondo bajo; el componente de distintivo de masa de iones es la parte de la fracción de marcaje que presenta preferiblemente un distintivo de masa iónica único en el análisis de MS; la suma de las masas de los átomos constituyentes del marcador es preferiblemente única y distinta a la de los fragmentos de todos los aminoácidos posibles. Como resultado, los aminoácidos y péptidos marcados se distinguen fácilmente de los no marcados por el patrón de iones/masa en el espectro de masas resultante. Preferiblemente, el componente de distintivo de masa de iones confiere una masa a un fragmento de proteína que no coincide con la masa de resto para ninguno de los 20 aminoácidos naturales.

El marcador debe ser robusto en las condiciones de fragmentación de la MS y no sufrir una fragmentación desfavorable. La química de marcaje debe ser eficaz en una selección de condiciones, particularmente en condiciones desnaturalizantes, y el marcador marcado permanece preferiblemente soluble en el sistema tampón de MS de elección. El marcador no suprime preferiblemente la eficacia de ionización de la proteína y no es reactivo químicamente. El marcador puede contener una mezcla de dos o más especies isotópicamente distintas para generar un patrón de espectrometría de masas único en cada posición del fragmento marcado. Los isótopos estables, tales como ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O o ^{34}S , son algunos marcadores no limitantes. Pueden prepararse también pares de patrones internos de péptidos que incorporan un marcador de isótopo diferente. Los restos de aminoácidos no limitantes a los que se puede incorporar un marcador de isótopos pesados incluyen leucina, prolina, valina y fenilalanina.

Los patrones internos de péptidos se caracterizan según su proporción de la masa con respecto a la carga (m/z), y preferiblemente, también según su tiempo de retención en una columna cromatográfica (p. ej., una columna de HPLC). Los patrones internos que se eluyen junto con péptidos no marcados de secuencia idéntica se seleccionan como patrones internos óptimos. A continuación, se analiza el patrón interno mediante la fragmentación del péptido por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por disociación inducida por colisión (CID) usando, p. ej., argón o helio como gas de colisión. A continuación, se analizan los fragmentos, por ejemplo, mediante espectrometría de masas de múltiples etapas (MS^n) para obtener un espectro de iones de fragmentos, para obtener un distintivo de fragmentación de péptidos. Preferiblemente, los fragmentos peptídicos tienen diferencias significativas en las proporciones de m/z para permitir que los máximos correspondientes a cada fragmento se separen bien y se obtenga un distintivo que sea único para el péptido diana. Si no se obtiene un distintivo de fragmento adecuado en la primera etapa, se realizan etapas adicionales de MS hasta que se obtiene un distintivo único.

Los iones de los fragmentos de los espectros MS/MS y MS^3 son normalmente muy específicos del péptido de interés y, junto con los métodos de LC, permiten un medio altamente selectivo de detectar y cuantificar un péptido/una proteína diana en una mezcla de proteínas complejas, tal como un lisado celular, que contiene muchos miles o decenas de miles de proteínas. Puede analizarse cualquier muestra biológica que contenga potencialmente una

Como se describe en la presente memoria, ciertas células normales (p. ej., células hepáticas) no expresan ninguna ROS quinasa (ni muestran ninguna actividad ROS quinasa), mientras que las células cancerosas de ese tipo de células sí lo hacen. Esto puede ser, por ejemplo, porque la célula cancerosa expresa un polipéptido ROS truncado o una proteína de fusión ROS (p. ej., un polipéptido de fusión FIG-ROS). La célula cancerosa también puede simplemente sobreexpresar la ROS quinasa de tipo silvestre, de longitud completa, (donde "sobreexpresar" simplemente significa que la célula cancerosa expresa más ROS quinasa que una célula no cancerosa de ese mismo tipo celular). Como se mencionó anteriormente, dicha sobreexpresión de ROS está incluida en la expresión "ROS mutante". Por ejemplo, como se describe a continuación, las células hepáticas normales no expresan ROS quinasa (y no muestran ninguna actividad ROS quinasa) mientras que las células cancerosas del hígado sí lo hacen. Por lo tanto, en algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la identificación de la presencia de la ROS quinasa (o la identificación de la presencia de actividad ROS quinasa) en un tipo de células que normalmente no expresa ROS (o que no muestra ninguna actividad ROS quinasa) puede ser un indicador de que la célula así identificada sea un cáncer que es probable que responda a un inhibidor de ROS. Esta identificación de la presencia de ROS quinasa (o actividad de ROS quinasa) puede seguirse con un análisis adicional de la ROS quinasa dentro de esa célula (p. ej., unión de una proteína en la célula con un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS mutante o hibridación de una molécula de ácido nucleico de la célula con una sonda que se hibrida con un polinucleótido ROS mutante).

También se describe en la presente memoria un método de identificación de un cáncer que es probable que responda a un inhibidor de ROS. El método incluye poner en contacto una muestra biológica de dicho cáncer que comprende al menos una molécula de ácido nucleico con una sonda nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas bien con un polinucleótido de fusión FIG-ROS (p.ej., un polinucleótido de fusión FIG-ROS (S), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (L)) o un polinucleótido ROS mutante, y en donde la hibridación de dicha sonda nucleotídica con al menos una molécula de ácido nucleico en dicha muestra biológica identifica dicho cáncer como un cáncer que es probable que responda a un inhibidor de ROS. En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS (S). En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS (L). En algunas realizaciones, el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL). En algunas realizaciones, el cáncer es de un paciente (p.ej., un paciente de cáncer). En realizaciones adicionales, el cáncer puede ser un cáncer de hígado, un cáncer de páncreas, un cáncer de riñón, un cáncer de testículo, o puede ser un cáncer de un conducto (p.ej., un cáncer de conducto biliar hepático o un cáncer de conducto pancreático).

Los métodos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo en una variedad de diferentes formatos de ensayo conocidos por los expertos en la técnica. Algunos ejemplos no limitantes de métodos incluyen inmunoensayos, y ensayos de péptidos y nucleótidos.

Inmunoensayos

Los inmunoensayos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria pueden ser inmunoensayos homogéneos o inmunoensayos heterogéneos. En un ensayo homogéneo, la reacción inmunológica implica habitualmente un reactivo específico del polipéptido ROS mutante (p. ej., un anticuerpo específico del polipéptido de fusión FIG-ROS), un analito marcado y la muestra biológica de interés. La señal que surge del marcador se modifica, directa o indirectamente, tras la unión del anticuerpo con el analito marcado. Tanto la reacción inmunológica como la detección de su extensión se llevan a cabo en una solución homogénea. Los marcadores inmunológicos que se pueden emplear incluyen radicales libres, radioisótopos, colorantes fluorescentes, enzimas, bacteriófagos, coenzimas, etc. También se pueden emplear ventajosamente marcadores de nanocristales semiconductores, o "puntos cuánticos", y su preparación y uso se han descrito. Véase, en general, K. Barovsky, *Nanotech. Law & Bus.* 1(2): artículo 14 (2004) y patentes citadas en la misma.

En un enfoque de ensayo heterogéneo, los reactivos son habitualmente la muestra biológica, un reactivo específico del polipéptido ROS quinasa mutante (p. ej., un anticuerpo), y medios adecuados para producir una señal detectable. Pueden usarse muestras biológicas como las descritas mejor más adelante. El anticuerpo, en general, está inmovilizado sobre un soporte, tal como una perla, una placa o un portaobjetos, y se pone en contacto con la muestra sospechosa de contener el antígeno en una fase líquida. El soporte se separa entonces de la fase líquida y se examina la fase de soporte o la fase líquida para detectar una señal detectable empleando medios para producir dicha señal. La señal está relacionada con la presencia del analito en la muestra biológica. Los medios para producir una señal detectable incluyen el uso de marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de enzimas, puntos cuánticos, etc. Por ejemplo, si el antígeno que se va a detectar contiene un segundo sitio de unión, puede conjugarse un anticuerpo que se une a ese sitio a un grupo detectable y añadirse a la solución de reacción en fase líquida antes de la etapa de separación. La presencia del grupo detectable en el soporte sólido indica la presencia del antígeno en la muestra de ensayo. Son ejemplos de inmunoensayos adecuados el radioinmunoensayo, métodos de inmunofluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas, y similares.

Los formatos de inmunoensayo y sus variaciones, que pueden ser útiles para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria, son bien conocidos en la técnica. Véase, en general, E. Maggio, "Enzyme-Immunoassay", (1980) (CRC Press, Inc., Boca Ratón, Fla.); véase también, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 4.727.022 (Skold *et al.*, "Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application"); la patente de EE.UU. n.º 4.659.678

(Forrest *et al.*, "Immunoassay of Antigens"); la patente de EE.UU. n.º 4.376.110 (David *et al.*, "Immunometric Assays Using Monoclonal Antibodies"). Las condiciones adecuadas para la formación de complejos de reactivo-anticuerpo son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase id. Los anticuerpos monoclonales específicos del polipéptido de fusión FIG-ROS pueden usarse en un ensayo de "dos sitios" o de tipo "sándwich", con una sola
 5 estirpe celular de hibridoma que sirve como fuente tanto para el anticuerpo monoclonal marcado como para el anticuerpo monoclonal unido. Dichos ensayos se describen en la patente de EE.UU. n.º 4.376.110. La concentración de reactivo detectable debe ser suficiente para que la unión del polipéptido de fusión FIG-ROS sea detectable en comparación con el fondo.

Los anticuerpos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria pueden conjugarse con un
 10 soporte sólido adecuado para un ensayo de diagnóstico (p. ej., perlas, placas, portaobjetos o pocillos formados a partir de materiales tales como látex o poliestireno) según técnicas conocidas, tales como precipitación. Los anticuerpos u otros reactivos de unión al polipéptido de fusión FIG-ROS pueden igualmente estar conjugados a grupos detectables tales como radiomarcadores (p. ej., ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina) y marcadores fluorescentes (p. ej., fluoresceína) según técnicas conocidas.

Los ensayos basados en células tales como la citometría de flujo (FC), inmunohistoquímica (IHC) o
 15 inmunofluorescencia (IF) son particularmente deseables en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria, ya que dichos formatos de ensayo son clínicamente adecuados, permiten la detección de la expresión de polipéptidos ROS mutantes *in vivo*, y evitan el riesgo de cambios artificiales en la actividad resultante de manipular células obtenidas de, p. ej., una muestra tumoral para obtener extractos. Por consiguiente, en algunas realizaciones,
 20 los métodos descritos en la presente memoria se implementan en un formato de ensayo de citometría de flujo (FC), inmunohistoquímica (IHC) o de inmunofluorescencia (IF).

Se puede emplear citometría de flujo (FC) para determinar la expresión del polipéptido ROS mutante en un tumor de mamífero antes, durante y después del tratamiento con un fármaco dirigido a inhibir la actividad de la ROS quinasa. Por ejemplo, se pueden analizar las células tumorales de la sustancia aspirada con aguja fina por citometría de flujo
 25 para la expresión y/o activación del polipéptido de fusión de FIG-ROS, así como para marcadores que identifican tipos de células de cáncer, etc., si así se desea. La citometría de flujo se puede llevar a cabo según métodos convencionales. Véase, p. ej. Chow *et al.*, *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46: 72-78 (2001). En resumen y a modo de ejemplo, se puede emplear el siguiente protocolo para el análisis citométrico: fijación de las células con paraformaldehído al 2 % durante 10 minutos a 37 °C, seguida de la permeabilización en metanol al 90 %
 30 en f0 minutos con hielo. Las células pueden entonces teñirse con el anticuerpo específico de polipéptido de fusión FIG-ROS primario, lavarse y marcarse con un anticuerpo secundario marcado fluorescente. A continuación, las células se analizarán en un citómetro de flujo (p. ej., un Beckman Coulter FC500) según los protocolos específicos del instrumento usado. Dicho análisis identificaría el nivel de polipéptido de fusión FIG-ROS expresado en el tumor. Un análisis similar después del tratamiento del tumor con un agente terapéutico inhibidor de ROS revelaría la
 35 capacidad de respuesta de un tumor que expresa un polipéptido de fusión FIG-ROS hacia el inhibidor dirigido de ROS quinasa.

También se puede emplear tinción de inmunohistoquímica (IHC) para determinar la expresión y/o estado de activación del polipéptido ROS quinasa mutante en un tumor de mamífero (p. ej., un cáncer de hígado o de páncreas) antes, durante y después del tratamiento con un fármaco dirigido a inhibir la actividad de la ROS quinasa. La IHC se puede llevar a cabo según técnicas conocidas. Véase, p. ej., "ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL",
 40 Capítulo 10, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988). En resumen, y a modo de ejemplo, se prepara tejido embebido en parafina (p. ej., tejido tumoral de una biopsia) para la tinción inmunohistoquímica por desparafinación de secciones de tejido con xileno seguido de etanol; la hidratación en agua, luego en PBS; el desenmascaramiento del antígeno calentando el portaobjetos en tampón de citrato de sodio; la incubación de las secciones en peróxido de hidrógeno; el bloqueo en la solución de bloqueo; la incubación del portaobjetos en anticuerpo anti-polipéptido de fusión FIG-ROS primario y anticuerpo secundario; y finalmente la detección usando el
 45 método de avidina/biotina ABC según las instrucciones del fabricante.

También se pueden emplear ensayos de inmunofluorescencia (IF) para determinar la expresión y/o el estado de activación del polipéptido de fusión FIG-ROS en un cáncer de mamífero antes, durante y después del tratamiento con un fármaco dirigido a inhibir la actividad de la ROS quinasa. La IF se puede llevar a cabo según técnicas conocidas. Véase, p. ej., J. M. polak y S. Van Noorden (1997) "INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY",
 50 2ª Ed.; ROYAL MICROSCOPY SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK 37, BioScientific/Springer-Verlag. En resumen y a modo de ejemplo, las muestras de pacientes pueden fijarse en paraformaldehído seguido de metanol, bloquearse con una solución de bloqueo tal como suero de caballo, incubarse con el anticuerpo primario contra el polipéptido de fusión FIG-ROS seguido de un anticuerpo secundario marcado con un colorante fluorescente tal como Alexa 488 y analizarse con un microscopio epifluorescente.
 55

Se conoce en la técnica una variedad de otros protocolos, incluyendo el ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), para la medición de polipéptidos ROS quinasa mutantes, y proporcionan una base para diagnosticar niveles modificados o
 60 anómalos de expresión del polipéptido de fusión FIG-ROS. Los valores normales o patrón para la expresión del polipéptido de fusión FIG-ROS se establecen combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de

sujetos mamíferos normales, preferiblemente seres humanos, con anticuerpo contra el polipéptido de fusión FIG-ROS en condiciones adecuadas para la formación de complejos. La cantidad de formación de complejo patrón puede cuantificarse mediante diversos métodos, pero preferiblemente por medios fotométricos. Se comparan las cantidades de polipéptido de fusión FIG-ROS expresadas en las presentes muestras, muestras de control y muestras de enfermos de tejidos biopsiados con los valores patrón. La desviación entre los valores patrón y los presentes valores establece los parámetros para el diagnóstico de la enfermedad.

Ensayos con péptidos y nucleótidos

De forma similar, los péptidos AQUA para la detección/cuantificación del polipéptido ROS mutante expresado en una muestra biológica que comprende células de un tumor pueden prepararse y usarse en ensayos de AQUA convencionales, como se describió con detalle anteriormente. Por consiguiente, en algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, el reactivo específico del polipéptido de fusión FIG-ROS comprende un fosfopéptido marcado con isótopo pesado (péptido AQUA) correspondiente a una secuencia peptídica que comprende la unión de fusión del polipéptido de fusión FIG-ROS, como se describió anteriormente.

Los reactivos específicos del polipéptido de fusión FIG-ROS útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria también pueden ser sondas de ARNm, oligonucleótido o ADN que pueden hibridarse directamente con, y detectar, las transcripciones de la expresión de polipéptido truncado o de fusión en una muestra biológica. Dichas sondas se analizan con detalle en la presente memoria. En resumen, y a modo de ejemplo, muestras de un paciente fijadas en formalina e incluidas en parafina pueden sondarse con una sonda de ARN marcada con fluoresceína, seguido de lavados con formamida, SSC y PBS, y un análisis con un microscopio de fluorescencia.

Los polinucleótidos que codifican un polipéptido ROS quinasa mutante también pueden usarse con fines de diagnóstico. Los polinucleótidos que pueden usarse incluyen secuencias oligonucleotídicas, moléculas de ADN y ARN antisentido, y PNA. Los polinucleótidos se pueden usar para detectar y cuantificar la expresión génica en tejidos de biopsia en los que la expresión de un polipéptido de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS truncado puede correlacionarse con una enfermedad. El ensayo de diagnóstico se puede usar para distinguir entre la ausencia, la presencia y un exceso de expresión de un polipéptido de fusión FIG-ROS y para controlar la regulación de los niveles de polipéptido de fusión FIG-ROS durante una intervención terapéutica.

En una realización, la hibridación con cebadores de PCR que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos, que incluyen secuencias genómicas, que codifican un polipéptido de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS quinasa truncado o moléculas muy relacionadas, se puede usar para identificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptido ROS mutante. La construcción y el uso de dichas sondas se describe en la presente memoria. La especificidad de la sonda, tanto si se produce a partir de una región muy específica, por ejemplo, 10 nucleótidos exclusivos en la unión de la fusión, o de una región menos específica, p. ej., la región codificante 3', y la rigurosidad de la hibridación o la amplificación (máxima, alta, intermedia o baja) determinará si la sonda identifica solo a las secuencias naturales que codifican el polipéptidos ROS quinasa mutante, alelos o secuencias relacionadas.

Las sondas también se pueden usar para la detección de secuencias relacionadas y preferiblemente deben contener al menos el 50% de los nucleótidos de cualquiera de las secuencias que codifican el polipéptido ROS mutante. Las sondas de hibridación descritas en la presente memoria pueden ser ADN o ARN y derivadas de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 16, englobando, lo más preferiblemente, la zona de unión de la fusión o de la secuencia genómica que incluya un promotor, elementos potenciadores e intrones de los polipéptidos FIG y ROS naturales, como se describió en detalle anteriormente.

Un polinucleótido de fusión FIG-ROS o polinucleótido ROS truncado descrito en la presente memoria se puede usar en análisis de la transferencia Southern o Northern, transferencias por puntos, u otras tecnologías basadas en membranas; en tecnologías de PCR; o en ensayos de bastones de inmersión, espigas, ELISA o de chip, utilizando fluidos o tejidos procedentes de biopsias de pacientes para detectar una expresión alterada del polipéptido ROS quinasa mutante. Dichos métodos cualitativos o cuantitativos son muy conocidos en la técnica. En un aspecto concreto, las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido ROS mutante pueden ser útiles en ensayos que detectan la activación o la inducción de diversos cánceres, incluyendo cánceres de hígado, páncreas, riñón y testículos (así como cánceres que surgen en los conductos tales como el conducto biliar, de estos tejidos). Los polinucleótidos ROS mutantes pueden marcarse mediante métodos convencionales y añadirse a una muestra de fluido o tejido procedente de un paciente en condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Tras un período de incubación adecuado, la muestra se lava y la señal se cuantifica y se compara con un valor patrón. Si la cantidad de señal en la muestra procedente de biopsia o extraída está significativamente alterada con respecto a la de una muestra de control comparable, las secuencias de nucleótidos se han hibridado con las secuencias de nucleótidos de la muestra, y la presencia de unos niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS quinasa truncado en la muestra indica la presencia de la enfermedad asociada. Dichos ensayos también se pueden usar para evaluar la eficacia de un determinado régimen de tratamiento terapéutico en estudios animales, en ensayos clínicos o para el control del tratamiento de un paciente individual.

- También se describe en la presente memoria un método de diagnóstico de un paciente que tiene un cáncer o cáncer sospechoso generado por una ROS quinasa. El método incluye poner en contacto una muestra biológica de dicho cáncer o cáncer sospechoso (donde la muestra biológica comprende al menos una molécula de ácido nucleico) con una sonda que se hibrida en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en un polinucleótido de fusión FIG-ROS, un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS, un polipéptido de fusión CD74-ROS y un polinucleótido ROS truncado, y en donde la hibridación de dicha sonda con al menos una molécula de ácido nucleico en dicha muestra biológica identifica que dicho paciente tiene un cáncer o un cáncer sospechoso generado por una ROS quinasa.
- En la presente memoria, se describe además un método de diagnóstico de un paciente que tiene un cáncer o cáncer sospechoso generado por una ROS quinasa. El método incluye poner en contacto una muestra biológica de dicho cáncer o cáncer sospechoso (donde dicha muestra biológica comprende al menos un polipéptido) con un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS mutante, en donde la unión específica de dicho agente de unión a al menos un polipéptido en dicha muestra biológica identifica a dicho paciente como aquel que tiene un cáncer o un cáncer sospechoso generado por una ROS quinasa.
- Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad (p. ej., un cáncer) caracterizada por la expresión del polipéptido ROS mutante (p. ej., un polipéptido de fusión FIG-ROS (S)), se establece un perfil normal o patrón para la expresión. Esto puede lograrse combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, ya sean animales o seres humanos, con una secuencia, o un fragmento de la misma, que codifica el polipéptido de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS quinasa truncado, en condiciones adecuadas para la hibridación o la amplificación. La hibridación del patrón puede cuantificarse comparando los valores obtenidos de sujetos normales con los de un experimento en donde se usa una cantidad conocida de un polinucleótido esencialmente purificado. Los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con valores obtenidos de muestras de pacientes sintomáticos para la enfermedad. La desviación entre los valores patrón y los valores en cuestión se usa para establecer la presencia de la enfermedad.
- Una vez que se establece la enfermedad y se inicia un protocolo de tratamiento, los ensayos de hibridación pueden repetirse de forma regular para evaluar si el nivel de expresión en el paciente comienza a aproximarse a lo observado en el paciente normal. Los resultados obtenidos a partir de ensayos sucesivos pueden usarse para mostrar la eficacia del tratamiento durante un período que varía de varios días a meses.
- Los usos diagnósticos adicionales para los polinucleótidos de fusión FIG-ROS y los polinucleótidos ROS truncados (es decir, que bien carecen de las secuencias que codifican el dominio extracelular de ROS de tipo silvestre o carecen de las secuencias que codifican los dominios tanto extracelular como transmembrana de ROS de tipo silvestre) pueden implicar el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), otro formato de ensayo que es convencional para los expertos en la técnica. Véase, p. ej., "MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL", 2ª edición, Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Los oligómeros de PCR se pueden sintetizar químicamente, generar enzimáticamente o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros consistirán preferiblemente en dos secuencias de nucleótidos, una con la orientación sentido (5' a 3') y otra con la orientación antisentido (3' a 5'), y se emplean en condiciones optimizadas para la identificación de un trastorno o gen específico. Los mismos dos oligómeros, conjuntos anidados de oligómeros, o incluso una agrupación degenerada de oligómeros se pueden usar en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de ADN o ARN muy relacionadas.
- Los métodos que también se pueden usar para cuantificar la expresión del polipéptido de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS quinasa truncado incluyen el radiomarcaje o la biotilación de nucleótidos, la coamplificación de un ácido nucleico de control, y las curvas patrón en las que se interpolan los resultados experimentales (Melby *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 159: 235-244 (1993); Duplaa *et al.* *Anal. Biochem.* 229-236 (1993)). La velocidad de cuantificación de múltiples muestras puede acelerarse realizando el ensayo en un formato ELISA, en el que el oligómero de interés se presenta en diversas diluciones, y una respuesta espectrofotométrica o colorimétrica proporciona una cuantificación rápida.
- En otra realización descrita en la presente memoria, los polinucleótidos ROS mutantes descritos en la presente memoria se pueden usar para generar sondas de hibridación que son útiles para la cartografía de la secuencia genómica natural. Las secuencias se pueden cartografiar en un cromosoma concreto o en una región específica del cromosoma usando técnicas muy conocidas. Estas técnicas incluyen hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), FACS o construcciones de cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, construcciones P1 bacterianas o bibliotecas de ADNc de cromosomas individuales, como se revisa en Price, C. M., *Blood Rev.* 7: 127-134 (1993), y Trask, B. J., *Trends Genet.* 7: 149-154 (1991).
- En una realización, se emplea hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) (como se describe en Verma *et al.* "HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES", Pergamon Press, Nueva York, N. Y. (1988)), y puede correlacionarse con otras técnicas de cartografía de cromosomas física y datos de mapas genéticos. La técnica FISH es bien conocida (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.756.696; 5.447.841; 5.776.688; y 5.663.319). Pueden encontrarse ejemplos de datos de mapas genéticos en "1994 *Genome Issue of Science*" (265: 1981f). La correlación entre la ubicación del gen que codifica el polipéptido de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS

truncado sobre un mapa cromosómico físico y una enfermedad específica, o la predisposición a una enfermedad específica, puede ayudar a delimitar la región del ADN asociada con esa enfermedad genética. Las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria se pueden usar para detectar diferencias en las secuencias génicas entre individuos normales, portadores o afectados.

- 5 La hibridación *in situ* de preparados cromosómicos y las técnicas de cartografía de mapas físicos, tales como el análisis de enlaces usando marcadores cromosómicos establecidos, se pueden usar para extender los mapas genéticos. A menudo, la colocación de un gen sobre el cromosoma de otra especie de mamífero, tal como un ratón, puede revelar marcadores asociados, incluso si se desconoce el número o el brazo de un determinado cromosoma humano. Pueden asignarse nuevas secuencias a brazos cromosómicos, o a sus partes, mediante cartografía de mapas físicos. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que están buscando genes de enfermedades usando clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Tras haberse ubicado de forma general la enfermedad o el síndrome mediante el enlace genético con una región genómica concreta, por ejemplo, AT con 11q22-23 (Gatti *et al. Nature* 336:577-580 (1988)), cualquier cartografía de secuencias de la zona puede representar genes asociados o reguladores para una posterior investigación. La secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria también se puede usar para detectar diferencias en la ubicación cromosómica debidas a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

Se entenderá que todos los métodos (por ejemplo, PCR y FISH) que detectan polinucleótidos ROS mutantes (p. ej., ROS de tipo silvestre expresada de forma aberrante, polinucleótidos de fusión FIG-ROS, polinucleótidos de fusión SLC34A2-ROS y polinucleótidos de fusión CD74-ROS descritos en la presente memoria) se pueden combinar con otros métodos que detectan bien polinucleótidos ROS mutantes o polipéptidos ROS mutantes. Por ejemplo, a la detección de un polinucleótido FIG-ROS en el material genético de una muestra biológica (p. ej., FIG-ROS (S) en una célula tumoral circulante) puede seguirle un análisis de transferencia Western o de inmunohistoquímica (IHC) de las proteínas de la muestra para determinar si el polinucleótido FIG-ROS (S) se expresaba realmente como un polipéptido de fusión FIG-ROS (S) en la muestra biológica. Dichos análisis de transferencia Western o de IHC pueden realizarse usando un anticuerpo que se una específicamente al polipéptido codificado por el polinucleótido FIG-ROS (S) detectado, o los análisis pueden realizarse usando anticuerpos que se unan específicamente bien a FIG de longitud completa (p.ej., al extremo N-terminal de la proteína) o a ROS de longitud completa (p. ej., unirse a un epítipo en el dominio quinasa de ROS). Dichos ensayos son conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 7.468.252).

- 30 En otro ejemplo, la tecnología de CISH de Dako permite la hibridación *in situ* cromatogénica con inmunohistoquímica en la misma sección tisular. Véase Elliot *et al., Br J Biomed Sci* 2008; 65(4):167-171, 2008 para consultar una comparación de CISH y FISH.

Como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "muestra biológica" se usa en su sentido más amplio, y significa cualquier muestra biológica sospechosa de contener un polipéptido de fusión FIG-ROS, un polinucleótido de fusión FIG-ROS, un polinucleótido ROS truncado, un polipéptido ROS truncado (es decir, bien carente de las secuencias codificantes del dominio extracelular de ROS de tipo silvestre o carente de las secuencias codificantes de los dominios tanto extracelular como transmembrana de tipo silvestre, ROS de longitud completa), un polinucleótido ROS truncado o un fragmento del mismo, y puede comprender una célula, cromosomas aislados de una célula (por ejemplo, una propagación de cromosomas en metafase), ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido tal como para el análisis de Southern), ARN (en solución o unido a un soporte sólido tal como para el análisis Northern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido), un extracto de células, sangre, orina, médula o un tejido y similares

Las muestras biológicas útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria pueden obtenerse de cualquier mamífero en el que haya un cáncer caracterizado por la presencia de un polipéptido de fusión FIG-ROS o pueda estar presente o en desarrollo. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "caracterizado por" con respecto a un cáncer y una molécula indicada (p. ej., una fusión ROS o una ROS mutante) significa un cáncer en el que una translocación o mutación génica (p. ej., causante de sobreexpresión de ROS de tipo silvestre) y/o un polipéptido expresado (p. ej., un polipéptido de fusión FIG-ROS) está presente, en comparación con un cáncer o un tejido normal en el que dicha translocación, sobreexpresión de ROS de tipo silvestre y/o polipéptido de fusión no están presentes. La presencia de dicha translocación, sobreexpresión de ROS de tipo silvestre y/o polipéptido de fusión puede conducir (es decir, estimular o ser el agente causante de), en su totalidad o en parte, el crecimiento y la supervivencia de dicho cáncer o sospecha de cáncer.

En una realización, el mamífero es un ser humano, y el ser humano puede ser un candidato para un agente terapéutico inhibidor de ROS, para el tratamiento de un cáncer, p. ej., un cáncer de hígado, páncreas, riñón o testicular. El candidato humano puede ser un paciente que se esté tratando con, o que se considere para EL tratamiento con, un inhibidor de ROS quinasa. En otra realización, el mamífero es un animal de gran tamaño, tal como un caballo o una vaca, mientras que, en otras realizaciones, el mamífero es un animal de pequeño tamaño, tal como un perro o un gato, siendo todos ellos conocidos por desarrollar cánceres, incluyendo de hígado, de riñón, testicular y pancreático.

- 60 Cualquier muestra biológica que comprenda células (o extractos de células) procedentes de un cáncer de mamífero

es adecuada para su uso en los métodos descritos en la presente memoria. En una realización, la muestra biológica comprende células obtenidas a partir de una biopsia de tumor. La biopsia puede obtenerse, según las técnicas clínicas convencionales, a partir de tumores primarios que aparezcan en el órgano de un mamífero, o de tumores secundarios que han metastatizado hacia otros tejidos. En otra realización, la muestra biológica comprende células obtenidas a partir de materia aspirada con una aguja fina extraída de un tumor y las técnicas para obtener dichas materias aspiradas son muy conocidas en la técnica (véase Cristallini *et al.*, *Acta Cytol.* 36(3): 416-22 (1992)).

En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende células tumorales circulantes. Las células tumorales circulantes ("CTC") pueden purificarse, por ejemplo, usando los kits y reactivos comercializados con las marcas registradas Vita-Assays™, Vita-Cap™ y CellSearch® (disponibles en el mercado en Vitatex, LLC (una compañía de Johnson and Johnson). Se describen otros métodos de aislamiento de CTC (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO/2002/020825, Cristofanilli *et al.*, *New Engl. J. of Med.* 351 (8):781-791 (2004), y Adams *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 130 (27): 8633-8641 (julio de 2008)). En una realización particular, una célula tumoral circulante ("CTC") puede aislarse e identificarse como originada en el pulmón.

En la presente memoria, también se describe un método de aislamiento de una CTC y, después, seleccionar una CTC en uno o más formatos de ensayo para identificar la presencia de un polipéptido o polinucleótido ROS mutante descrito en la presente memoria (p. ej., polipéptido o polinucleótido de fusión FIG-ROS) en la CTC. Algunos formatos de ensayo no limitantes incluyen análisis de transferencia Western, citometría de flujo (FC), inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una CTC de un paciente que se identifica como que comprende un polipéptido o polinucleótido ROS mutante descrito en la presente memoria (p. ej., un polipéptido o polinucleótido de fusión FIG-ROS) puede indicar que el cáncer que se origina en el paciente (p. ej., un cáncer de pulmón tal como un cáncer pulmonar no microcítico) es probable que responda a una composición que comprende al menos un agente terapéutico inhibidor de la ROS quinasa.

Una muestra biológica puede comprender células (o extractos celulares) de un cáncer en el que el polipéptido de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS mutante (p. ej., que carece de los dominios extracelular y transmembrana) se expresa y/o se activa, pero la ROS quinasa de tipo silvestre no. Como alternativa, la muestra puede comprender células de un cáncer en el que tanto un polipéptido de fusión ROS mutante como una ROS quinasa de tipo silvestre se expresan y/o se activan, o en el que se expresa y/o se activa la ROS quinasa de tipo silvestre, pero el polipéptido de fusión ROS no.

Los extractos celulares de las muestras biológicas anteriores pueden prepararse, ya sea en bruto o parcialmente (o completamente) purificados, según técnicas convencionales, y usarse en los métodos descritos en la presente memoria. Como alternativa, se pueden usar muestras biológicas que comprendan células enteras en formatos de ensayo tales como inmunohistoquímica (IHC), citometría de flujo (FC) e inmunofluorescencia (IF), como se describió más en detalle anteriormente. Dichos ensayos de células enteras son ventajosos, porque minimizan la manipulación de la muestra de células tumorales y reducen así los riesgos de alterar el estado de activación/señalización *in vivo* de las células y/o introducir señales artificiales. Los ensayos de células enteras también son ventajosos, porque caracterizan la expresión y la señalización solo en células tumorales, en lugar de una mezcla de células tumorales y normales.

En la práctica del método descrito para determinar si un compuesto inhibe la progresión de un tumor caracterizado por la translocación y/o polipéptido de fusión FIG-ROS, también se pueden emplear de forma ventajosa muestras biológicas que comprendan células de xenoinjertos de mamíferos (o trasplantes de médula ósea). Los xenoinjertos no limitantes (o receptores de trasplantes) son pequeños mamíferos, tales como ratones, que albergan tumores humanos (o leucemias) que expresan un polipéptido de fusión FIG-ROS (o una ROS quinasa mutante que contiene el dominio quinasa, pero carece de los dominios transmembrana y extracelular). Los xenoinjertos que albergan tumores humanos son muy conocidos en la técnica (véase Kal, *Cancer Treat Res.* 72: 155-69 (1995)), y la producción de xenoinjertos de mamífero que albergan tumores humanos ha sido bien descrita (véase, Winograd *et al.*, *In Vivo.* 1(1):1-13 (1987)). De manera similar, la generación y el uso de modelos de trasplante de médula ósea está bien descrito (véase, por ejemplo, Schwaller, *et al.*, *EMBO J.* 17: 5321-333 (1998); Kelly *et al.*, *Blood* 99: 310-318 (2002)).

Al evaluar la presencia del polinucleótido ROS mutante o la expresión del polipéptido ROS mutante en una muestra biológica que comprende células de un tumor de cáncer de mamífero, se puede emplear deseablemente con fines comparativos una muestra de control que represente una célula en donde dicha translocación y/o proteína de fusión no se produzca. Idealmente, la muestra de control comprende células de un subconjunto del cáncer en particular (p. ej., cáncer de hígado de conducto biliar) que es representativo del subconjunto en donde no se produce la mutación (p. ej., translocación de FIG-ROS) y/o el polipéptido de fusión no se expresa. La comparación del nivel en la muestra de control frente a la muestra biológica de ensayo identifica de este modo si el polinucleótido y/o el polipéptido mutante/s está/n presente/s. Como alternativa, dado que el polinucleótido y/o polipéptido de fusión FIG-ROS puede no estar presente en la mayoría de los cánceres, puede emplearse como control cualquier tejido que, de manera similar, no exprese el polipéptido ROS mutante (ni albergue el polinucleótido mutante).

Los métodos descritos a continuación serán de una valiosa utilidad diagnóstica para los cánceres caracterizados por

polinucleótido y/o polipéptido ROS mutante, y las decisiones de tratamiento correspondientes a los mismos. Por ejemplo, se pueden obtener muestras biológicas de un sujeto que no haya sido diagnosticado previamente de tener un cáncer caracterizado por una translocación de polipéptido FIG-ROS y/o polipéptido de fusión, ni haya sido sometido a tratamiento por dicho cáncer, y el método se emplea para identificar diagnósticamente un tumor en dicho sujeto como perteneciente a un subconjunto de tumores (p. ej., un tumor de conducto biliar) en donde el polinucleótido y/o polipéptido ROS mutante está presente/expresado.

Como alternativa, se puede obtener una muestra biológica de un sujeto que haya sido diagnosticado de tener un cáncer caracterizado por la presencia de un tipo de quinasa, tal como EGFR, y que ha estado recibiendo tratamiento, tal como la terapia con inhibidor de EGFR (p. ej., Tarceva™, Iressa™) para el tratamiento de dicho cáncer, y el método descrito en la presente memoria se emplea para identificar si el tumor del sujeto también se caracteriza por un polipéptido FIG-ROS de translocación y/o de fusión, y por lo tanto es probable que responda completamente al tratamiento existente y/o si es deseable o justificable una terapia alternativa o inhibidora adicional de ROS. Los métodos descritos en la presente memoria también pueden emplearse para controlar la progresión o inhibición de un cáncer que expresa un polipéptido ROS mutante después del tratamiento de un sujeto con una composición que comprende un agente terapéutico inhibidor de ROS o una combinación de agentes terapéuticos.

Dicho ensayo de diagnóstico puede llevarse a cabo después o antes de la evaluación preliminar o procedimientos de vigilancia quirúrgica. El método de identificación descrito en la presente memoria puede emplearse ventajosamente como diagnóstico para identificar pacientes que tienen cáncer, tal como cáncer de hígado de conducto biliar, caracterizado por la presencia de la proteína de fusión FIG-ROS, cuyos pacientes tendrían mayor probabilidad de responder a agentes terapéuticos dirigidos a inhibir la actividad de ROS quinasa. La capacidad de seleccionar dichos pacientes también sería útil en la evaluación clínica de la eficacia de futuras terapias dirigidas a ROS, así como en la prescripción en el futuro de dichos fármacos a pacientes.

La capacidad para identificar selectivamente los cánceres en los que hay presente/s una translocación y/o polipéptido de fusión FIG-ROS permite nuevos métodos importantes para identificar con precisión dichos tumores con fines de diagnóstico, así como obtener información útil para determinar si dicho tumor es probable que responda a una composición terapéutica inhibidora de ROS o probable a ser parcial o totalmente no reactivo a un inhibidor dirigido a una quinasa diferente cuando se administra como un solo agente para el tratamiento del cáncer.

Por consiguiente, en la presente memoria, se describe un método para detectar la presencia de un polinucleótido y/o polipéptido ROS mutante en un cáncer, comprendiendo el método las etapas de: (a) obtener una muestra biológica de un paciente que tiene cáncer; y (b) utilizar al menos un reactivo que detecte un polinucleótido o polipéptido ROS mutante descrito en la presente memoria para determinar si un polinucleótido y/o polipéptido de fusión FIG-ROS está/n presente/s en la muestra biológica.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de hígado, tal como un cáncer de conducto biliar hepático. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de páncreas, un cáncer de riñón o un cáncer de testículo. En otras realizaciones, la presencia de un polipéptido de fusión FIG-ROS identifica un cáncer que es probable que responda a una composición o agente terapéutico que comprende al menos un compuesto inhibidor de ROS.

En algunas realizaciones, los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria se implantan en un formato de ensayo de citometría de flujo (FC), inmunohistoquímica (IHC) o inmunofluorescencia (IF). En otra realización, se detecta la actividad del polipéptido de fusión FIG-ROS. En otras realizaciones, los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria se implantan en un formato de ensayo de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la presente memoria, se describe un método para determinar si un compuesto inhibe la progresión de un cáncer caracterizado por un polinucleótido o polipéptido de fusión FIG-ROS, comprendiendo dicho método la etapa de determinar si dicho compuesto inhibe la expresión y/o actividad de dicha fusión FIG-ROS en dicho cáncer. En una realización, la inhibición de la expresión y/o actividad del polipéptido de fusión FIG-ROS se determina usando al menos un reactivo que detecta un polinucleótido o polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria. Los compuestos adecuados para la inhibición de la actividad de la ROS quinasa se describen con más detalle en la presente memoria.

Las sondas polinucleotídicas de ROS mutante y los reactivos específicos de polipéptidos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria se describieron con mayor detalle anteriormente. En una realización, el reactivo específico de polipéptido de fusión FIG-ROS comprende un anticuerpo específico del polipéptido de fusión. En otra realización, el reactivo específico de polipéptido de fusión comprende un fosfopéptido marcado con isótopo pesado (péptido AQUA) que corresponde a la unión de fusión del polipéptido de fusión FIG-ROS.

Los métodos descritos en la presente memoria descritos anteriormente también pueden comprender opcionalmente la etapa de determinar el nivel de expresión o activación de otras quinasas, tales como ROS y EGFR de tipo silvestre u otras moléculas de señalización cadena abajo en dicha muestra biológica. El perfil de tanto la expresión/activación del polipéptido de fusión FIG-ROS como de la expresión/activación de otras quinasas y vías en una muestra biológica dada puede proporcionar información valiosa sobre qué quinasa/s y vía/s está/n generando la

enfermedad y qué régimen terapéutico es, por tanto, probable que sea de mayor beneficio.

El descubrimiento de los polipéptidos ROS mutantes (p. ej., los polipéptidos de fusión FIG-ROS) en cáncer humano también permite el desarrollo de nuevos compuestos que inhiben la actividad de estas proteínas ROS mutantes, particularmente su actividad de ROS quinasa. Por consiguiente, en la presente memoria, también se describe un método para determinar si un compuesto inhibe la progresión de un cáncer caracterizado por un polinucleótido y/o un polipéptido de fusión FIG-ROS, comprendiendo dicho método la etapa de determinar si dicho compuesto inhibe la expresión y/o actividad de dicho polipéptido de fusión FIG-ROS en dicho cáncer. En una realización, la inhibición de la expresión y/o actividad del polipéptido de fusión FIG-ROS se determina usando al menos un reactivo que detecte un polinucleótido de fusión FIG-ROS y/o polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes de dichos reactivos descritos en la presente memoria se han descrito anteriormente. Los compuestos adecuados para la inhibición de la actividad ROS quinasa se describen con más detalle a continuación.

Como se emplea en la presente memoria, un "inhibidor de ROS" o un "compuesto inhibidor de ROS" significa cualquier composición que comprende uno o más compuestos, productos químicos o biológicos, que inhiben, directa o indirectamente, la expresión y/o actividad de bien una ROS de tipo silvestre (longitud completa) o el dominio quinasa de ROS, bien solo y/o como parte de los polipéptidos de fusión FIG-ROS descritos en la presente memoria. Dicha inhibición puede ser *in vitro* o *in vivo*. "Agente terapéutico inhibidor de ROS" o "agente terapéutico que inhibe ROS" significa un compuesto inhibidor de ROS usado como agente terapéutico para tratar a un paciente que tiene un cáncer (p. ej., un cáncer de hígado, testículo, riñón o páncreas) caracterizado por la presencia de un polipéptido de fusión FIG-ROS descrito en la presente memoria.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el inhibidor de ROS es un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS, un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS mutante, un ARNip dirigido a un polinucleótido de fusión FIG-ROS (p. ej., un polinucleótido de fusión FIG-ROS (S)) o un ARNip dirigido a un polinucleótido ROS mutante.

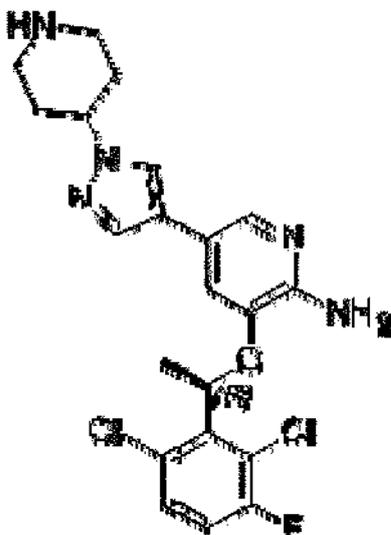
El compuesto inhibidor de ROS puede ser, por ejemplo, un inhibidor de quinasas, tal como un inhibidor de molécula pequeña o de anticuerpo. Puede ser un inhibidor de panquinasas con actividad contra varias quinasas diferentes, o un inhibidor específico de quinasa. Dado que ROS, ALK, LTK, InsR e IGF1R pertenecen a la misma familia de tirosina quinasas, pueden compartir una estructura similar en el dominio quinasa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un inhibidor de ROS de la invención también inhibe la actividad de una ALK quinasa, una LTK quinasa, un receptor de insulina o un receptor de IGF1. Los compuestos inhibidores de ROS se describen con más detalle a continuación. Las muestras biológicas de los pacientes pueden tomarse antes y después del tratamiento con el inhibidor y después analizarse, usando los métodos descritos anteriormente, para determinar el efecto biológico del inhibidor sobre la actividad ROS quinasa, que incluye la fosforilación de la proteína sustrato cadena abajo. Dicho ensayo farmacodinámico puede ser útil para determinar la dosis biológicamente activa del fármaco que puede ser preferible a una dosis máxima tolerable. Dicha información también sería útil en propuestas para la aprobación de fármacos demostrando el mecanismo de acción del fármaco.

También se describe en el presente documento que el polipéptido de fusión FIG-ROS puede aparecer en al menos un subgrupo de cáncer de hígado, páncreas, riñón y testículo humano. Por consiguiente, la progresión de un cáncer de mamífero (p.ej., cáncer de hígado, páncreas, riñón o testículo) en el que se expresa una proteína de fusión FIG-ROS puede inhibirse, *in vivo*, inhibiendo la actividad de la ROS quinasa en dicho cáncer. La actividad ROS en los cánceres caracterizados por la expresión de un polipéptido de fusión FIG-ROS (o un polipéptido ROS mutante que comprende solo el dominio quinasa) puede inhibirse poniendo en contacto el cáncer (p. ej., un tumor) con un agente terapéutico inhibidor de ROS. Por consiguiente, la invención proporciona, en parte, un compuesto para su uso en la inhibición de la progresión de un cáncer que expresa el polipéptido de fusión FIG-ROS mediante la inhibición de la expresión y/o actividad de la ROS quinasa en el cáncer.

Un agente terapéutico inhibidor de ROS puede ser cualquier composición que comprenda al menos un inhibidor de ROS. Dichas composiciones también incluyen composiciones que comprenden solamente un único compuesto inhibidor de ROS, así como composiciones que comprenden múltiples agentes terapéuticos (incluyendo aquellos contra otras RTK), que también pueden incluir un agente terapéutico no específico como un agente quimioterapéutico o un inhibidor general de la transcripción.

El agente terapéutico inhibidor de ROS para su uso según la invención es un inhibidor de molécula pequeña, dirigido. Los inhibidores dirigidos de molécula pequeña son una clase de moléculas que normalmente inhiben la actividad de su enzima diana uniéndose de forma específica, y a menudo irreversible, con el sitio catalítico de la enzima y/o uniéndose a una hendidura de unión a ATP u otro sitio de unión dentro de la enzima que evite que la enzima adopte una configuración necesaria para su actividad. Un inhibidor de quinasa dirigido de molécula pequeña es Gleevec[®] (Imatinib, STI-571), que inhibe CSFIR y BCR-ABL, y sus propiedades están bien descritas. Véase Dewar *et al*, *Blood* 105(8): 3127-32 (2005). Otros inhibidores de quinasa de molécula pequeña adicionales que se pueden dirigir a ROS incluyen TAE-684 (véanse los siguientes ejemplos) y PF-02341066 (Pfizer, Inc).

PF-02341066 tiene la estructura:



Inhibidores adicionales de molécula pequeña y otros inhibidores (por ejemplo, inhibidores indirectos) de la actividad de ROS quinasa pueden diseñarse racionalmente usando modelos cristalográficos de rayos X o por modelización informática de la estructura tridimensional de ROS, o pueden encontrarse mediante rastreo de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos para la inhibición de enzimas reguladoras cadena arriba clave y/o moléculas de unión 5 necesarias, lo que da lugar a la inhibición de la actividad de ROS quinasa. Dichos enfoques son muy conocidos en la técnica y se han descrito. La inhibición de ROS por dichos agentes terapéuticos puede confirmarse, por ejemplo, examinando la capacidad del compuesto para inhibir la actividad ROS, pero no otra actividad quinasa, en un panel de quinastas, y/o examinando la inhibición de la actividad ROS en una muestra biológica que comprende células cancerosas (por ejemplo, células de cáncer de hígado, páncreas, riñón o testículo). Los métodos para identificar 10 compuestos que inhiben un cáncer caracterizado por la expresión/presencia de translocación y/o polipéptido de fusión FIG-ROS, y/o polinucleótido y/o polipéptido ROS mutante, se describen además a continuación.

Los agentes terapéuticos inhibidores de ROS útiles en los métodos descritos en la presente memoria también pueden ser anticuerpos dirigidos que se unan específicamente a sitios o dominios críticos catalíticos o de unión 15 requeridos para la actividad ROS e inhiben la quinasa bloqueando el acceso de ligandos, sustratos o moléculas secundarias a y/o impidiendo que la enzima adopte una configuración necesaria para su actividad. La producción, la selección y el uso terapéutico de anticuerpos específicos de dianas humanizadas ha sido bien descrito. Véase, Merluzzi *et al.*, *Adv. Clin. Path.* 4(2):77-85 (2000). Se dispone de sistemas y tecnologías comerciales, tales como la biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos de Morphosys, Inc.'s (HuCAL[®]), para la generación y selección de 20 alto rendimiento de anticuerpos inhibidores específicos de diana humanizados.

Se ha descrito la producción de diversos anticuerpos dirigidos anti-receptores de quinastas y su uso para inhibir la actividad del receptor diana. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040202655, la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040086503, la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040033543. En la 25 técnica, se conocen métodos estandarizados para producir y usar anticuerpos inhibidores de la actividad de la tirosina quinasa receptora. Véase, por ejemplo, la patente europea n.º EP1423428.

También se pueden emplear enfoques de presentación de fagos para generar inhibidores de anticuerpos específicos de ROS, y se describen protocolos para la construcción de bibliotecas de bacteriófagos y la selección de anticuerpos recombinantes en el texto de referencia bien conocido "CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY", Colligan *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), Capítulo 17, Apartado 17.1. Véase también la patente de EE.UU. n.º 6.319.690, la patente de EE.UU. n.º 6.300.064, la patente de EE.UU. n.º 5.840.479 y la publicación de patente de 30 EE.UU. n.º 20030219839.

Puede producirse una biblioteca de fragmentos de anticuerpos mostrados sobre la superficie de bacteriófagos (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.300.064) y rastrearse en busca de la unión a una proteína de fusión FIG-ROS descrita en la presente memoria. Un fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido de fusión FIG-ROS se identifica como una molécula candidata para bloquear la activación constitutiva del polipéptido de fusión FIG-ROS 35 en una célula. Véase la patente europea n.º EP1423428.

Los anticuerpos dirigidos de unión a ROS identificados en el rastreo de las bibliotecas de anticuerpos, como se describió anteriormente, después pueden explorarse en busca de su capacidad para bloquear la actividad de ROS, tanto en un ensayo de quinastas *in vitro* como en estirpes celulares y/o tumores *in vivo*. La inhibición de ROS puede 40 confirmarse, por ejemplo, examinando la capacidad de dicho agente terapéutico de anticuerpo para inhibir la actividad ROS quinasa en un panel de quinastas, y/o examinando la inhibición de la actividad ROS en una muestra

biológica que comprende células cancerosas, como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, un compuesto inhibidor de ROS para su uso según la invención reduce la actividad de ROS quinasa, pero reduce la actividad quinasa de otras quinanas en menor grado (o nada en absoluto). Los métodos de selección de dichos compuestos para la inhibición de ROS quinasa se describieron en más detalle anteriormente.

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

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

- 20 Los compuestos o agentes terapéuticos inhibidores de ROS también pueden comprender compuestos inhibidores de la transcripción y/o anti-sentido que inhiben la actividad de ROS quinasa bloqueando la transcripción del gen que codifica ROS y/o el gen de la fusión FIG-ROS. Se ha descrito la inhibición de diversas quinanas receptoras, que incluyen VEGFR, EGFR, e IGFR, y FGFR, por agentes terapéuticos antisentido para el tratamiento del cáncer. Véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 6.734.017; 6.710.174, 6.617.162; 6.340.674; 5.783.683; 5.610.288.

- 25 Pueden diseñarse y construirse oligonucleótidos antisentido, y emplearse como agentes terapéuticos contra genes diana según técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Cohen, J., *Trends in Pharmacol. Sci.* 10(11): 435-437 (1989); Marcus-Sekura, *Anal. Biochem.* 172: 289-295 (1988); Weintraub, H., *Sci. AM.* pág. 40-46 (1990); Van Der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6(10): 958-976 (1988); Skorski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1994) 91: 4504-4508. La inhibición del crecimiento de carcinomas humanos *in vivo* usando un inhibidor de ARN antisentido de EGFR se ha descrito recientemente. Véase la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040047847. De igual manera, un agente terapéutico inhibidor de ROS que comprende al menos un oligonucleótido antisentido contra un gen ROS de mamífero o un polinucleótido de fusión FIG-RIS o polinucleótido ROS mutante puede prepararse según métodos descritos anteriormente. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas que comprendan compuestos antisentido inhibidores de ROS y administrarse como se describe en más detalle a continuación.

- 35 Las composiciones de moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip), que inhiben la traducción y, por consiguiente, la actividad, de ROS a través del proceso de interferencia del ARN, también se puede usar de forma deseable en los métodos descritos en la presente memoria. También se han descrito la interferencia del ARN y la silenciación selectiva de la expresión de la proteína diana mediante la introducción de moléculas de ARN bicatenarias pequeñas exógenas que comprenden una secuencia complementaria al ARNm que codifica la proteína diana. Véase, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040038921, la publicación de patente de EE.UU. n.º 20020086356 y la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040229266.

- 40 Las moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) han demostrado bloquear la expresión de genes mediante un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia del ARN (ARNi). En resumen, la ARNasa III Dicer procesa el ARNbc en ARN interferente pequeño (ARNip) de aproximadamente 22 nucleótidos, que sirve como secuencia guía para inducir la escisión del ARNm específica de la diana por un complejo silenciador inducido por ARN RISC (véase Hammond *et al.*, *Nature* (2000) 404: 293-296). El ARNi implica una reacción de tipo catalítico mediante la que se generan nuevos ARNip a través de la escisión sucesiva de ARNbc más largo. Así pues, a diferencia del antisentido, el ARNi degrada el ARN diana de una manera no estequiométrica. Cuando se administra a una célula o a un organismo, el ARNbc exógeno ha demostrado dirigir la degradación específica de la secuencia del ARN mensajero endógeno (ARNm) a través del ARNi.

- 50 Una amplia variedad de productos de ARNip específicos de la diana, que incluyen vectores y sistemas para su expresión y uso en células de mamífero, se encuentran actualmente disponibles en el mercado. Véase, p. ej., Promega, Inc. (www.promega.com); Dharmacon, Inc. (www.dharmacon.com). Se dispone de manuales técnicos detallados sobre el diseño, la construcción y el uso de ARNbc para ARNi. Véase por ejemplo, "RNAi Technical Reference & Application Guide" de Dharmacon; "RNAi: A Guide to Gene Silencing" de Promega. También se dispone en el mercado de productos de ARNip inhibidores de ROS, y se pueden emplear de modo adecuado en el método descrito en la presente memoria. Véase, p. ej., Dharmacon, Inc., Lafayette, CO (catálogos n.º M-003162-03, MU-003162-03, D-003162-07 a -10 (ARNip siGENOME™ SMARTselection y SMARTpool®)).

Recientemente, se ha establecido que los ARNbc pequeños con una longitud inferior a 49 nucleótidos, y preferiblemente 19-25 nucleótidos, que comprenden al menos una secuencia que es esencialmente idéntica a parte de una secuencia de ARNm diana, y ARNbc que tiene óptimamente al menos una proyección de 1-4 nucleótidos en

un extremo, son los más eficaces en la mediación del ARNi en mamíferos. Véanse las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 20040038921 y 20040229266. La construcción de dichos ARNbc y su uso en preparaciones farmacéuticas para silenciar la expresión de una proteína diana *in vivo* se describe en detalle en dichas publicaciones.

5 Si se conoce la secuencia del gen diana en un mamífero, se pueden producir ARN de 21-23 nt, por ejemplo, y ensayarse para su capacidad para la mediación del ARNi en una célula de mamífero, tal como una célula humana o de otro primate. Estas moléculas de ARN de 21-23 nt que han demostrado mediar en el ARNi pueden ensayarse, si se desea, en un modelo animal apropiado para evaluar también su eficacia *in vivo*. Los sitios diana que se conocen, por ejemplo, los sitios diana que se ha determinado que son sitios diana eficaces basándose en estudios con otras moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ribozimas o antisentido, o las dianas que se sabe que están asociadas con una enfermedad o una afección, tales como los sitios que contienen mutaciones o eliminaciones, se pueden usar para diseñar moléculas de ARNip dirigidas también a esos sitios.

10 Como alternativa, se pueden predecir/diseñar de forma lógica las secuencias de los ARNbc eficaces mediante la exploración del ARNm diana de interés en busca de sitios diana, por ejemplo, usando un algoritmo de plegamiento informático. La secuencia diana puede analizarse por medios informáticos para producir una lista de todos los fragmentos o subsecuencias de una determinada longitud, por ejemplo, fragmentos de 23 nucleótidos, usando programas de análisis de secuencias comerciales o secuencias de instrucciones Perl adaptadas, tales como Oligo, MacVector, o el paquete GCG Wisconsin.

15 Se pueden usar diversos parámetros para determinar qué sitios diana son los más adecuados dentro de la secuencia de ARN diana. Estos parámetros incluyen, pero no se limitan a, la estructura secundaria o terciaria del ARN, la composición de bases nucleotídicas de la secuencia diana, el grado de homología entre diversas regiones de la secuencia diana, o la posición relativa de la secuencia diana dentro de la transcripción del ARN. Basándose en estas determinaciones, se puede escoger cualquier número de sitios diana dentro de la transcripción del ARN para explorar las moléculas de ARNip según su eficacia, por ejemplo, usando ensayos de escisión de ARN *in vitro*, cultivos celulares o modelos animales. Véase, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. n.º 20030170891. También se ha descrito recientemente un algoritmo para identificar y seleccionar sitios diana de ARNi. Véase la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040236517.

20 Las técnicas de transferencia de genes que se usan habitualmente incluyen los métodos de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación y microinyección, y métodos víricos (Graham *et al.* (1973) *Virol.* 52: 456; McCutchan *et al.* (1968), *J. Natl. Cancer Inst.* 41: 351; Chu *et al.* (1987), *Nucl. Acids Res.* 15: 1311; Fraley *et al.* (1980), *J. Biol. Chem.* 255: 10431; Capecchi (1980), *Cell* 22: 479). El ADN también puede introducirse en las células usando liposomas catiónicos (Feigner *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 84: 7413). Las formulaciones de lípidos catiónicos disponibles en el mercado incluyen Tfx 50 (Promega) o Lipofectamin 200 (Life Technologies). Como alternativa, se pueden emplear vectores víricos para transportar el ARNbc a una célula y mediar en el ARNi. Véase la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040023390.

25 La transfección y los sistemas de expresión/vectores para el ARNi en células de mamífero se encuentran disponibles en el mercado, y se han descrito bien. Véase, por ejemplo, Dharmacon, Inc., sistema DharmaFECT™; Promega, Inc., sistema de horquilla U6 siSTRIKE™; véase también Gou *et al.* (2003) *FEBS.* 548, 113-118; Sui, G. *et al.* "A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells" (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 5515-5520; Yu *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6047-6052; Paul, C. *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 19, 505-508; McManus *et al.* (2002) *RNA* 8, 842-850.

30 A continuación, se puede efectuar la interferencia de ARNip en un mamífero usando moléculas de ARNbc preparadas administrando un preparado farmacéutico que comprende el ARNbc al mamífero. La composición farmacéutica se administra a una dosis suficiente para inhibir la expresión del gen diana. El ARNbc normalmente puede administrarse a una dosis inferior a 5 mg de ARNbc por kilogramo de peso corporal al día, y es suficiente para inhibir o suprimir completamente la expresión del gen diana. En general, una dosis adecuada de ARNbc estará en el intervalo de 0,01 a 2,5 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor al día, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 200 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 100 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, aún más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 50 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, y lo más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 25 microgramos por kilogramo de peso corporal al día. Una composición farmacéutica que comprende el ARNbc se administra una vez al día, o en múltiples subdosis, por ejemplo, usando formulaciones de liberación sostenida muy conocidas en la técnica. La preparación y administración de dichas composiciones farmacéuticas puede llevarse a cabo según técnicas convencionales, como se describe en más detalle a continuación.

35 Dichos ARNbc se pueden usar luego para inhibir la expresión y la actividad de ROS en un cáncer, preparando un preparado farmacéutico que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc, como se describió anteriormente, y administrando el preparado a un sujeto humano que tenga un cáncer (p. ej., un cáncer de hígado, páncreas, riñón o testículo) que exprese una proteína de fusión FIG-ROS o polipéptido ROS mutante, por ejemplo, mediante inyección directa al tumor. La inhibición similar de otras tirosina quinasa receptoras, tales como VEGFR y EGFR, usando inhibidores de ARNip se ha descrito recientemente. Véase la publicación de patente de EE.UU. n.º

20040209832, la publicación de patente de EE.UU. n.º 20030170891 y la publicación de patente de EE.UU. n.º 20040175703.

5 Las composiciones terapéuticas inhibidores de ROS para su uso según la invención pueden administrarse a un mamífero por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, vías oral o peritoneal, incluyendo las vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, aérea (aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluyendo bucal y sublingual).

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

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

30 Las composiciones terapéuticas inhibidoras de ROS también pueden incluir formulaciones encapsuladas para proteger el agente terapéutico (por ejemplo, un compuesto de ARNbc o un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS) contra la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EEUU n.º 4.522.811; la publicación PCT WO 91/06309; y la publicación de patente europea EP-A-43075. Una formulación encapsulada puede comprender una proteína de la cubierta vírica. La proteína de cubierta vírica puede derivarse o estar asociada con un virus, tal como un virus de polioma, o puede ser parcial o totalmente artificial. Por ejemplo, la proteína cubierta puede ser una proteína de virus 1 y/o una proteína de virus 2 del virus del polioma, o uno de sus derivados.

45 Los compuestos inhibidores de ROS también pueden comprender un vehículo de administración, incluyendo liposomas, para la administración a un sujeto, vehículos y diluyentes y sus sales, y/o pueden estar presentes en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los métodos para la administración de moléculas de ácido nucleico se describen en Akhtar *et al.*, 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; "DELIVERY STRATEGIES FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS", ed. Akhtar, 1995, Maurer *et al.*, 1999, *Mol. Membr. Biol.*, 16, 129-140; Holland y Huang, 1999, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137, 165-192; y Lee *et al.*, 2000, *ACS Symp. Ser.*, 752, 184-192. La patente de EE.UU. n.º 6.395.713 y la publicación PCT n.º WO 94/02595 describen además los métodos generales para la administración de moléculas de ácido nucleico. Estos protocolos se pueden utilizar para la administración de casi cualquier molécula de ácido nucleico.

55 Los agentes terapéuticos inhibidores de ROS (es decir, un compuesto inhibidor de ROS que se administra como un agente terapéutico) se pueden administrar a un tumor de mamífero mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, la encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante la incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos (véase la publicación PCT n.º WO 00/53722). Como alternativa, la combinación de agente terapéutico/vehículo se administra de modo local mediante una inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. La inyección directa de la composición, ya sea subcutánea, intramuscular o intradérmica, puede tener lugar usando metodologías convencionales de aguja y jeringa, o mediante tecnologías sin aguja como las descritas en Corny *et al.*, 1999, *Clin. Cancer Res.*, 5, 2330-2337 y la publicación PCT
60

n.º WO 99/31262.

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

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

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

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

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

Una dosis farmacéuticamente eficaz es aquella dosis requerida para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar un

síntoma hasta cierto grado, preferiblemente todos los síntomas) de un estado patológico. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, de la composición usada, de la vía de administración, del tipo de mamífero que se esté tratando, de las características físicas del mamífero considerado en particular, de la medicación concurrente y de otros factores que los expertos en Medicina reconocen. En general, se administra una

5 cantidad entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal/día de principios activos dependiendo de la potencia del polímero cargado negativamente.

Unos niveles de dosis del orden de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal al día son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas anteriormente (de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente al día). La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales

10 vehículo para producir una forma de dosificación unitaria varía dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Las formas de dosificación unitaria, en general, contienen entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un principio activo. Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en concreto depende de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad

15 concreta sometida a tratamiento.

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

20 resultar conveniente presentar la composición como una premezcla para la adición al pienso o al agua para beber.

Un agente terapéutico inhibidor de ROS útil en la práctica de la descripción puede comprender un solo compuesto como se describió anteriormente, o una combinación de múltiples compuestos, ya sea en la misma clase de inhibidor (p. ej., anticuerpo inhibidor) o en diferentes clases (p. ej., inhibidores de anticuerpos e inhibidores de molécula pequeña). Dicha combinación de compuestos puede aumentar el efecto terapéutico global en la inhibición

25 de la progresión de un cáncer que expresa la proteína de fusión. Por ejemplo, la composición terapéutica puede incluir un inhibidor de molécula pequeña, tal como STI-571(Gleevec[®]) solo o en combinación con otros análogos de Gleevec[®] dirigidos a la actividad de ROS y/o inhibidores de molécula pequeña de EGFR, tales como Tarceva[™] o Iressa[™]. La composición terapéutica también puede comprender uno o más agentes quimioterapéuticos no específicos además de uno o más inhibidores dirigidos. Dichas combinaciones han demostrado recientemente proporcionar un efecto sinérgico de destrucción del tumor en muchos cánceres. La eficacia de dichas combinaciones para inhibir la actividad de ROS y el crecimiento tumoral *in vivo* puede evaluarse como se describe a continuación.

30

En la presente memoria, se describe un método para determinar si un compuesto inhibe la progresión de un cáncer (p. ej., un cáncer de hígado, páncreas, riñón o testículo) caracterizado por una translocación y/o polipéptido de fusión FIG-ROS o caracterizado por un polinucleótido o polipéptido ROS mutante, mediante la determinación de si dicho compuesto inhibe la actividad de ROS quinasa del polipéptido ROS mutante en el cáncer. En algunas realizaciones, la inhibición de la actividad de ROS se determina examinando una muestra biológica que comprende células de médula ósea, sangre o un tumor. En otra realización, la inhibición de la actividad de ROS se determina usando al menos un reactivo específico del polinucleótido o polipéptido ROS mutante.

35

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

40

Otra técnica para la detección de fármacos que se puede usar proporciona una detección de alto rendimiento de compuestos que tienen afinidad de unión adecuada hacia una proteína de interés, como se describe en la publicación PCT WO 84/03564. En este método, cuando se aplica a los polipéptidos de fusión FIG-ROS descritos en la presente memoria, se sintetiza un gran número de compuestos de ensayo pequeños diferentes sobre un sustrato sólido, tal como varillas de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo se hacen reaccionar con el polipéptido de fusión FIG-ROS, o fragmentos del mismo, y se lavan. El polipéptido unido (por ejemplo, el polipéptido de fusión FIG-ROS (L), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (S)) después se detecta mediante métodos muy conocidos en la técnica. Un polipéptido de fusión FIG-ROS purificado también se puede recubrir directamente sobre placas para su uso en las técnicas de rastreo de fármacos anteriormente mencionadas. Como alternativa, se pueden usar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

45

Un compuesto encontrado que es un inhibidor eficaz de la actividad ROS *in vitro* se puede examinar después para determinar su capacidad para inhibir la progresión de un cáncer que exprese el polipéptido de fusión FIG-ROS (tal como cáncer de hígado, cáncer de testículo, cáncer de riñón o cáncer de páncreas), *in vivo*, usando, por ejemplo, xenoinjertos de mamífero que albergan tumores humanos de hígado, páncreas, riñón o testículo (p. ej., cánceres de conductos biliares) que expresan un polipéptido de fusión FIG-ROS. En este procedimiento, estirpes celulares que se sabe que expresan una proteína de fusión FIG-ROS (p. ej., una FIG-ROS (S), FIG-ROS (XL) o FIG-ROS (L))

55

60

puede colocarse por vía subcutánea en un animal (p. ej., en un ratón desnudo o SCID u otro animal inmunocomprometido). Las células después crecen produciéndose una masa tumoral que puede controlarse de modo visual. A continuación, se puede tratar el animal con el fármaco. El efecto del tratamiento con el fármaco sobre el tamaño del tumor puede observarse externamente. A continuación, se sacrifica al ratón y se extirpa el tumor para su análisis mediante IHC y transferencia Western. De forma similar, se pueden preparar trasplantes de médula ósea de mamíferos mediante métodos convencionales para examinar la respuesta a los fármacos en tumores hematológicos que expresen una proteína con ROS quinasa mutante. De esta forma, los efectos del fármaco pueden observarse en un emplazamiento biológico que se parece mucho a un paciente. La capacidad del fármaco para alterar la señalización en las células tumorales o en las células estromales circundantes puede determinarse mediante un análisis con anticuerpos específicos de la fosforilación. La eficacia del fármaco para inducir la muerte celular o la inhibición de la proliferación celular también puede observarse mediante un análisis con marcadores específicos de la apoptosis, tales como caspasa 3 rota y PARP escindida.

Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción de DL50/DE50. En algunas realizaciones, los compuestos presentan altos índices terapéuticos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo para ilustrar mejor la invención y las descripciones, y no pretenden limitar su alcance, a menos que se proporcione en las reivindicaciones adjuntas a la presente memoria. La presente invención abarca modificaciones y variaciones de los métodos enseñados en la presente memoria que serían evidentes para un experto en la técnica. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales, a menos que se indique lo contrario.

EJEMPLO 1

Identificación de la actividad de ROS quinasa en pacientes con cáncer de hígado mediante formación de perfiles de fosfopéptidos globales

Se examinó el perfil de fosforilación global de la activación de quinastas en varios pacientes humanos con cáncer de hígado, incluyendo los pacientes XY3-78T y 090665LC, usando una poderosa técnica recientemente descrita para el aislamiento y la caracterización espectrométrica de masas de péptidos modificados de mezclas complejas (la técnica "IAP", véase la publicación de patente de EE.UU. n.º 20030044848, Rush *et al.*, "Immunoaffinity Isolation of Modified Peptides from Complex Mixtures"). La técnica de IAP se realizó usando un anticuerpo específico de la fosfotirosina (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Beverly, MA, 2003/04 n.º de catálogo 9411) para aislar y posteriormente caracterizar péptidos que contienen fosfotirosina de extractos de las estirpes de células de cáncer de hígado de 23 pacientes humanos y tejidos paratumorales.

Muestras de células de cáncer de hígado

Se recogieron tumores hepáticos (n = 23) de resecciones quirúrgicas de pacientes cuando se disponía de suficiente material para el análisis PhosphoScan, extracciones de ARN y ADN. Según el sistema de gradación de Edmondson, todas las muestras tumorales tienen grados de diferenciación II-III. Los tumores extraídos se congelaron en nitrógeno líquido según métodos convencionales.

Inmunoprecipitación de fosfopéptidos

Se homogenizó un total de 0,2 g a 0,5 g de tejido tumoral y se lisó en tampón de lisis de urea (HEPES 20 mM, pH 8,0, urea 9 M, vanadato de sodio 1 mM, pirofosfato de sodio 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1 mM) a $1,25 \times 10^8$ células/ml y se sonicó. Los lisados sonicados se aclararon mediante centrifugación a 20.000 x g, y las proteínas se redujeron y alquilaron como se describió previamente (véase, Rush *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23(1): 94-101 (2005)). Las muestras se diluyeron con HEPES 20 mM, pH 8,0, hasta una concentración final de urea de 2 M. Se añadió tripsina (1 mg/ml en HCl 0,001 M) al lisado aclarado a 1:100 v/v. Las muestras se digirieron durante la noche a temperatura ambiente.

Tras la digestión, los lisados se acidificaron hasta una concentración final de TFA al 1 %. Los fosfopéptidos se prepararon usando el kit PhosphoScan disponible en el mercado en Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). En resumen, se llevó a cabo la purificación de los péptidos usando columnas Sep-Pak C₁₈ según se describió previamente (véase Rush *et al.*, *supra.*). Después de la purificación, se combinaron todas las eluciones (acetónitrilo al 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % y 40 % en TFA al 0,1 %) y se liofilizaron. Se volvieron a suspender los péptidos secados en 1,4 ml de tampón MOPS (MOPS 50 mM/NaOH, pH 7,2, Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 50 mM) y el material insoluble se retiró mediante centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos.

Se acopló el anticuerpo monoclonal de fosfotirosina P-Tyr-100 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) procedente de fluido de ascitis de modo no covalente a esferas de agarosa-proteína G (Roche) a 4 mg/ml de esferas durante la noche a 4 °C. Después del acoplamiento, se lavó la resina-anticuerpo dos veces con PBS y tres veces con tampón MOPS. Se añadió el anticuerpo inmovilizado (40 µl, 160 µg) como una suspensión 1:1 en tampón MOPS

IP a la fracción de péptidos solubilizada, y se incubó la mezcla durante la noche a 4 °C. Se lavaron las esferas de anticuerpos inmovilizados tres veces con tampón MOPS y dos veces con ddH₂O. Los péptidos se eluyeron dos veces de las esferas mediante una incubación con 40 µl de TFA al 0,1 % durante 20 minutos cada una, y se combinaron las fracciones.

5 Análisis mediante espectrometría de masas LC-MS/MS

Se concentraron los péptidos de la fracción eluida de IP (40 µl) y se separaron del anticuerpo eluido usando puntas de extracción Stop and Go (StageTips) (véase, *Rappsilber et al., Anal. Chem., 75(3): 663-70 (2003)*). Los péptidos se eluyeron de las microcolumnas con 1 µl de MeCN al 60 %, TFA al 0,1 % hacia 7,6 µl de ácido acético al 0,4 %/ácido heptafluorobutírico al 0,005 % (HFBA). Se cargó la muestra en una columna capilar de 10 cm x 75 µm PicoFrit (New Objective) rellena de resina de fase inversa Magic C18 AQ (Michrom Bioresources) usando un muestreador automático Famos con una válvula de inyección de muestras inerte (Dionex). La columna se reveló con un gradiente lineal de 45 min de acetonitrilo en ácido acético al 0,4 %, HFBA al 0,005 %, administrado a 280 nl/min (Ultimate, Dionex).

Se recogieron los espectros de masas en tándem como se describió previamente (Rikova *et al., Cell* 131: 1190-1203-, 2007). En resumen, se concentraron péptidos que contenían pTyr en micropuntas de fase inversa. Se realizó un análisis de LC-MS/MS con un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap, y la exactitud de la masa peptídica de 10 ppm fue no de los filtros usados para la identificación de los péptidos (Thermo Fisher Scientific). Se recogieron las muestras con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap, usando un método de los diez primeros, un recuento de repetición de exclusión dinámica de 1 y una duración de la repetición de 30 s. Los espectros de MS se recogieron en el componente Orbitrap del espectrómetro de masas y los espectros de MS/MS se recogieron en el LTQ.

Análisis de la base de datos y asignaciones

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

Se realizaron búsquedas en la base de datos de NCBI humano emitida el 04/03/2008 que contiene 37.742 proteínas que permiten una metionina oxidada (M+16) y una fosforilación (Y+80) como modificaciones dinámicas.

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

Por este motivo, es apropiado usar criterios adicionales para validar las asignaciones de fosfopéptidos. Es probable que las asignaciones sean correctas si se cumple cualquiera de estos criterios adicionales: (i) se asigna la misma secuencia a iones coeluyentes con diferentes estados de carga, dado que el espectro de MS/MS cambia notablemente con el estado de carga; (ii) el sitio se encuentra en más de un contexto de secuencia peptídica debido a que la secuencia se solapa por una proteólisis incompleta o el uso de proteasas distintas de la tripsina; (iii) el sitio se encuentra en más de un contexto de secuencia peptídica debido a isoformas de proteínas homólogas, pero no idénticas; (iv) el sitio se encuentra en más de un contexto de secuencia peptídica debido a proteínas homólogas, pero no idénticas, entre especies; y (v) sitios validados mediante análisis de MS/MS de fosfopéptidos sintéticos correspondientes a secuencias asignadas, puesto que el espectrómetro de masas de atrapamiento de iones produce unos espectros de MS/MS muy reproducibles. Este último criterio se emplea habitualmente para confirmar nuevas asignaciones de sitios de particular interés.

Todos los espectros y todas las asignaciones de secuencias realizadas mediante Sequest se importaron a una base de datos relacional. Las secuencias asignadas fueron aceptadas mediante un filtrado para los valores XCorr de al menos 1,5 y un intervalo de error de masa en 10 ppm.

Los anteriores análisis de IAP identificaron muchas proteínas con tirosina fosforilada, la mayoría de las cuales eran nuevas (datos no mostrados). Entre los 23 pacientes con cáncer de hígado, tres tenían cáncer hepático de conducto biliar. Dos pacientes con cáncer hepático de conducto biliar, en concreto, los pacientes XY3-78T y 090665LC, tenían muestras de cáncer hepático que resultaron contener tirosina quinasa ROS fosforilada, que no se detectó mediante análisis de MS en el tejido adyacente al tumor ni en ninguna de las muestras de los 21 pacientes restantes.

EJEMPLO 2

Aislamiento y secuenciación del gen de fusión FIG-ROS

Dada la presencia de la forma activada de ROS quinasa detectada en dos muestras de pacientes de cáncer de hígado, se realizó una amplificación rápida 5' de los extremos del ADNc en la secuencia codificante del dominio quinasa de ROS, para determinar si estaba presente una transcripción de ROS quimérica.

Amplificación rápida de los extremos del ADN complementario

Se empleó el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) para extraer ARN de las muestras tumorales humanas. El ADN se extrajo con el uso del kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen). La amplificación rápida de los extremos del ADNc se realizó con el uso del sistema 5' RACE (Invitrogen) con los cebadores ROS-GSP1 para la síntesis del ADNc, y ROS-GSP2 y ROS-GSP3.1 para una reacción de PCR anidada, seguidos por los productos de la PCR de clonación y secuenciación.

Para el sistema 5' RACE, se usaron los siguientes cebares:

ROS-GSP1: 5'ACCCTTCTCGGTTCTTCGTTTCCA

Para la reacción de PCR anidada, se usaron los siguientes cebares:

ROS-GSP2: 5'TCTGGCGAGTCCAAAGTCTCCAAT
ROS-GSP3.1: 5'CAGCAAGAGACGCAGAGTCAGTTT

La secuenciación de los productos de PCR reveló que las ROS quinasas de las muestras de los pacientes de XY3-78T y 090665LC eran, de hecho, productos de una transcripción de ROS quimérico, en concreto, una fusión de parte de una transcripción de ROS con parte de una transcripción de un gen de FIG. El análisis de secuencias reveló que ambos pacientes XY3-78T y 090665LC tenían células de cáncer de hígado que contenían proteína de fusión resultante de la fusión del extremo C-terminal de ROS con el extremo N-terminal de FIG (véase la Fig. 2, paneles B y C). Las fusiones FIG-ROS de ambas muestras estaban en fase. En el paciente XY3-78T, una proteína de fusión más corta, en concreto, FIG-ROS (S) resultó de la fusión de los 209 primeros aminoácidos de FIG a los 421 últimos aminoácidos de ROS. En el paciente 090665LC, una proteína de fusión más larga, en concreto, FIG-ROS (L), resultó de la fusión de los 412 primeros aminoácidos de FIG a los 466 últimos aminoácidos de ROS.

Además, se descubre una tercera fusión de FIG-ROS (FIG-ROS (XL)), donde la fusión se produce después del exón 7 del gen de FIG y antes del exón 32 del gen ROS. La secuencia de ácido nucleico para la región codificante del gen de fusión se proporciona en SEQ ID NO: 16 y la secuencia de aminoácidos para el polipéptido de fusión codificado por el gen de fusión se proporciona en SEQ ID NO: 17.

EJEMPLO 3

Detección de la expresión de ROS quinasa mutante en una muestra de cáncer humano usando un ensayo PCR

Se detectó la presencia de ROS quinasa mutante y/o una proteína de fusión FIG-ROS de la invención (p. ej., FIG-ROS(S) o FIG-ROS(S)) en una muestra de cáncer humano usando ADNc o transcriptasa inversa genómica (RT) y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos métodos se han descrito previamente. Véase, p. ej., Cools *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 348: 1201-1214 (2003).

Ensayo de PCR

Para confirmar que se había producido la fusión de FIG-ROS, se realizó RT-PCR sobre ARN extraído de muestras de células de cáncer de hígado de los pacientes XY3-78T y 090665LC. Para la RT-PCR, se sintetizó el ADNc de primera cadena a partir de 2,5 µg de ARN total con el uso del sistema de síntesis de primera cadena Superscript™ III (Invitrogen) con oligo (dT)₂₀. A continuación, se amplificó el gen de fusión FIG-ROS con el uso de pares de cebadores FIG-F2 y ROS-GSP3.1. Sus secuencias son:

FIG-F2: 5'ACTGGTCAAAGTGCTGACTCTGGT
ROS-GSP3.1: 5'CAGCAAGAGACGCAGAGTCAGTTT.

Como se muestra en la Fig. 3, las muestras de células de cáncer de hígado del paciente XY3-78T contenían ARNm predicho como codificante del polipéptido de fusión FIG-ROS (S). Las muestras de células de cáncer de hígado del paciente 090665LC contenían ARNm predicho como codifican del polipéptido de fusión FIG-ROS (L). Como control,

se realizó RT-PCR sobre ARN aislado de la estirpe celular U118MG, un glioblastoma humano conocido por contener la translocación de FIG-ROS (S). Las células U118MG se adquirieron de la colección americana de cultivos tipo (Manassas, VA) y se cultivaron en DMEM con FBS al 10 %.

- 5 Para determinar si las muestras de células del hígado del paciente 090665LC, muestras de células del hígado del paciente XY3-78T o las estirpes celulares de glioblastoma humano U118MG expresaban la FIG longitud completa o ROS de longitud completa, se realizó la RT-PCR usando los cebadores FIG-F2 y ROS-GSP3.1 para amplificar la translocación de FIG-ROS, así como los pares de cebadores siguientes para amplificar la FIG de tipo silvestre (es decir, FIG de longitud completa), ROS de tipo silvestre y, como un control, GAPDH de tipo silvestre.

El gen de FIG de tipo silvestre se amplificó con el uso de pares de cebadores FIG-F3 y FIG-R8.

- 10 FIG-F3: 5' TTGGATAAGGAACTGGCAGGAAGG
FIG-R8: 5'ACCGTCATCTAGCGGAGTTTCACT.

El gen de ROS de tipo Silvestre se amplificó usando los pares de cebador ROS-Ex31F y ROS-GSP2.

ROS-EX31F: 5AGCCAAGGTCCTGCTTATGTCTGT
ROS-GSP2: 5'TCTGGCGAGTCCAAAGTCTCCAAT.

- 15 GAPDH de tipo silvestre se amplificó usando los pares de cebador GAPDH-F y GAPDH-R

GAPDH-F: 5'TGGAAATCCCATCACCATCT
GAPDH-R: 5'GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT.

- 20 Como se muestra en la Fig. 4, las células de cáncer de hígado de los pacientes XY3-78T y 090665LC expresan la FIG de tipo silvestre, pero ninguna expresa ROS de tipo silvestre. La estirpe celular U118MG no expresa FIG de tipo silvestre ni ROS de tipo silvestre. HCC78, una estirpe celular de cáncer de pulmón no microcítico humano, que contiene una translocación de SLC34A2-ROS, sirvió como un control negativo. Las células HCC78 se adquirieron en la ATCC (Manassas, VA), y se mantuvieron en DMEM con FBS al 10 %.

- 25 Para la PCR genómica, se extrajo ADN de las muestras de células con el uso del kit de tejidos DNeasy (Qiagen). La amplificación por PCR del gen de fusión se realizó con el uso del kit de PCR LongRange (Qiagen) con pares de cebadores FIG-F3 y ROS-GSP3.1 para XY3-78T

FIG-F3: 5' TTGGATAAGGAACTGGCAGGAAGG
ROS-GSP3.1: 5' CAGCAAGAGACGCAGAGTCAGTTT

La amplificación de PCR del gen de fusión se realice con el uso del kit de PCR LongRange (Qiagen) con los pares de cebadores FIG-F7 y ROS-GSP4.1 para 090665LC y U118MG.

- 30 FIG-F7: 5' TGTGGCTCCTGAAGTGGATTCTGA
ROS-GSP4.1: 5' GCAGCTCAGCCAACTCTTTGTCTT

- 35 Como se muestra en la Fig. 5, la translocación de FIG-ROS se produjo en el genoma de las células de cáncer de hígado de los pacientes XY3-78T y 090665LC. Aunque la estirpe celular U118MG expresa el mismo polipéptido de fusión FIG-ROS (L) que las células del paciente 090665LC, los puntos de corte genómicos exactos del gen de FIG y ROS entre estas dos muestras son diferentes. Se encontró que los puntos de corte eran:

XY3-78T

1-822 pb de FIG-Intrón 3
659-619 pb de ROS-Intrón 35
660-1.228 pb de ROS Intrón 35

- 40 090665LC

1-2402 pb de FIG-Intrón 7
2317-2937 pb de ROS-Intrón 34

U118MG

- 45 1-2304 pb de FIG-Intrón 7
583-2937 pb de ROS-Intrón 34

- 50 La secuencia de nucleótidos del intrón 3 del gen de FIG humano se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 5. La secuencia de nucleótidos del intrón 7 del gen de FIG humano se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 6. La secuencia de nucleótidos del intrón 34 del gen de ROS humano se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 7. La secuencia de nucleótidos del intrón 35 del gen de ROS humano se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 8.

Este ensayo se puede usar para detectar la presencia de una ROS quinasa mutante y/o una proteína de fusión de

FIG-ROS de la invención (p. ej., FIG-ROS (S) o FIG-ROS (S) en una muestra de cáncer humano en otras muestras de tejidos biológicos (p. ej., se pueden obtener muestras de tejido tumoral de un paciente que tiene cáncer de hígado, páncreas, riñón o testicular). Dicho análisis identificará a un paciente que tenga un cáncer caracterizado por la expresión de la ROS quinasa truncada (y/o la proteína de fusión FIG-ROS), cuyo paciente es probable que responda al tratamiento con un inhibidor de ROS.

EJEMPLO 4

Generación de retrovirus recombinante codificante de polipéptidos de fusión FIG-ROS

Se amplificó el marco de lectura abierto del gen de fusión FIG-ROS (L) y FIG-ROS (S) por PCR a partir de ADNc aislado de los pacientes 090665LC y XY3-78T, respectivamente, usando el siguiente par de cebadores (FIG-Fc: 5' ATGTCGGCGGGCGGTCCATG; ROS-Rc: 5'TTAATCAGACCCATCTCCAT). Se clonaron estos productos de PCR en el vector retroviral MSCV-Neo con un marcador Myc C-terminal (EQKLISEEDL) (vector MSCV-Neo y vector MSCV-puro están disponibles en el mercado de Clontech). También se generaron construcciones retrovirales recombinantes adicionales (p. ej., vector MSCV-Neo vacío, MSCV-puro-src, etc.). Se depositó el vector MSCV-Neo que contiene FIG-ROS (S) en la colección americana de cultivos tipo ("ATCC", Manassas, Virginia) bajo los términos del Tratado de Budapest del 21 de enero de 2009, y recibió la designación del depósito de patentes de la ATCC n.º PTA-9721.

Las construcciones retrovirales recombinantes resultantes (es decir, que contienen FIG-ROS (S) o FIG-ROS (L)) se transfectaron en células 293T para ser empaquetadas en un retrovirus recombinante capaz de infectar (y, por tanto, transducir) células. Para ello, se mantuvieron células 293T (p. ej., disponibles en el mercado de la ATCC) en DMEM al 10 % que contenía suero bovino fetal al 10 % en placas de cultivo de tejidos de 10 cm. 24-48 horas antes de la transfección, se sembraron las células 293T en placas al aproximadamente 50-80 % de confluencia. La transfección se realizó usando el reactivo FuGENE (disponible en el mercado en Roche Diagnostics), según las instrucciones del fabricante. Por lo general, para cada construcción recombinante, se usó una proporción de 3:1 del reactivo FuGENE (en ul) con respecto al ADN (ug) (p. ej., 3 ul de FuGENE con respecto a 1 ug de FIG-ROS (S) marcada con Myc en MSCV-Neo). 48 horas después de la transfección, se retiró el medio y se eliminó cualquier célula dentro del medio (que contenía ahora virus recombinante) filtrando el medio a través de un filtro de jeringa de 0,45 um. Los medios de comunicación (también denominados sopa vírica) se almacenaron a -80 °C

EJEMPLO 5

Expresión de proteínas de fusión FIG-ROS en células 3T3

Las células 3T3 se adquirieron en la colección americana de cultivos tipo (Manassas, VA). Las células 3T3 se cultivaron a 37 °C en medio DMEM con FBS al 10 %.

Se usó 1 ml de retrovirus recombinante codificante de los polipéptidos de fusión FIG-ROS generados como se describe en el Ejemplo 4 para transducir células 3T3 a partir de placas de 10 cm con confluencia al 50 %. Además, un retrovirus vacío (es decir, generado a partir de un vector vacío MSCV-Neo con un marcador Myc C-terminal) fue transducido en células 3T3 como control.

Las células 3T3 fueron infectadas con (es decir, transducidas con) retrovirus recombinante que expresa FIG-ROS (S) de XY3-78T, FIG-ROS (L) de 090665LC. También se usó retrovirus vacío para infectar células 3T3 como un control. Dos días después de la transducción, se añadieron 0,5 mg/ml de G418 al medio de cultivo celular. Dos semanas después de la transducción (es decir, 12 días después de la selección en G418), se lisó 1 millón de células y se realizó análisis de transferencia Western, tiñendo los lisados celulares resueltos electroforéticamente con un anticuerpo que se unió específicamente al dominio quinasa de ROS, así como un fosfo-anticuerpo contra ROS. Los lisados celulares también se sondaron con anticuerpos contra varios sustratos de señalización cadena abajo de la ROS quinasa incluyendo p-STAT3 (es decir, STAT3 fosforilado), STAT3, p-AKT (es decir, AKT fosforilado) y AKT. También se tiñó la b-actina para asegurar que cantidades equivalentes de lisados estuvieran presentes en todos los carriles. Todos los anticuerpos son de Cell Signaling Technology, Inc.

Como se muestra en la Fig. 6, las células 3T3 transducidas con retrovirus recombinante expresaron de forma estable FIG-ROS (S) y FIG-ROS (L). Como era de esperar, las células NC (vector vacío) no expresaron ninguna ROS. La expresión de FIG-ROS (S) y FIG-ROS (L) activan moléculas de señalización cadena abajo, STAT3 y AKT.

EJEMPLO 6

Expresión de proteínas de fusión FIG-ROS en cultivo de células 3T3 *in vitro* o *in vivo*

Las células 3T3 tienen inhibición de contacto, lo que significa que no forman colonias en agar blando. Para determinar si la presencia de ROS quinasa activa en estas células eliminaba su inhibición de contacto, se seleccionaron células 3T3 retroviralmente transducidas para G418 (0,5 mg/ml) durante 7 días y las células se cultivaron después en agar blando por triplicado durante 17 días. También se usó un retrovirus codificante de la versión corta de SLC34A2-ROS para transducir células 3T3. Como control, se usó también un retrovirus codificante

de la src quinasa para transducir células 3T3. Se adjunta el protocolo para el ensayo de agar blando.

Como se muestra en la Fig. 7, las células 3T3 transducidas con retrovirus codificantes bien de src quinasa o de FIG-ROS (S) perdieron su inhibición de contacto de forma espectacular. Esto proporciona evidencias de que la presencia de FIG-ROS (S) es capaz de conducir una célula a un estado de crecimiento canceroso. La presencia de FIG-ROS (L) también permitió a las células 3T3 perder su inhibición de contacto (véase la Figura 7, panel superior izquierdo), al igual que SLC34A2-ROS (S) (datos no mostrados), aunque el efecto no fue tan significativo como el observado en la FIG-ROS (S).

Además, se analizó la capacidad de las células 3T3 transducidas para formar tumores *in vivo*. Se inyectaron ratones desnudos inmunocomprometidos (que carecen de un timo, disponibles en el Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) con 1×10^6 células 3T3 transducidas con retrovirus que contenía vector vacío, FIG-ROS (L) o FIG-ROS (S). Los ratones se controlaron diariamente para determinar la formación y el tamaño del tumor, y se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 1 cm x 1 cm.

Como se muestra en la Fig. 8, dos semanas después de ser inyectados con células 3T3 transducidas bien con FIG-ROS (S) o con FIG-ROS (L), la formación de tumores era evidente en los ratones desnudos inyectados.

EJEMPLO 7

Localización subcelular de FIG-ROS (L) y FIG-ROS (S) en células 3T3

Se generaron vectores recombinantes para expresar versiones marcadas con Myc de FIG-ROS (L) y FIG-ROS (S), donde el marcador myc se incorporó en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión FIG-ROS. Las células 3T3 se transfectaron establemente con los vectores de expresión recombinantes o solo con un vector vacío "neo" (control).

La inmunofluorescencia se realizó con un protocolo convencional (disponible públicamente en Cell Signaling Technology, Inc.). En resumen, el anticuerpo 9E1H1D9 ROS, el anticuerpo marcador de Myc (CST n.º 2278) y el anticuerpo Golgin-97 eran de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA).

Como se muestra en las Fig. 9A y 9B, los dos polipéptidos de fusión FIG-ROS diferentes de la invención se ubican en diferentes zonas de la célula. FIG-ROS (L) se ubica en el aparato de Golgi, y se ubica junto con el marcador de Golgi (golgin-97) (véanse las imágenes bajo "Myc-FR (L)" en ambas Fig. 9A y 9B). Para la sorpresa de los inventores, el patrón de tinción de FIG-ROS (S) era citoplasmático (véanse las imágenes bajo "Myc-FR (S)" en ambas Fig. 9A y 9B), aunque contiene el segundo dominio superenrollado de FIG, lo que sugiere que el dominio superenrollado de FIG es necesario, pero no suficiente para dirigir la FIG-ROS (S) al aparato de Golgi. Esto puede deberse a que el dominio PDZ de FIG está presente en FIG-ROS (L), pero no en FIG-ROS (S). Curiosamente, SLC34A2-ROS (S) se localizó en el compartimiento paranuclear (véanse las imágenes bajo "Myc-SR (S)" en ambas Fig. 9A y 9B). El hecho de que la fusión SLC34A2-ROS (S), que contiene el dominio transmembrana de ROS, se ubica en el compartimiento perinuclear sugiere que el dominio transmembrana de ROS también contribuye a su ubicación.

Así pues, diferentes fusiones de ROS tienen distinta ubicación subcelular, lo que sugiere que pueden activar diferentes sustratos *in vivo*.

EJEMPLO 8

Actividad de FIG-ROS(L) y FIG-ROS(S) en células BaF3 transducidas

Las células BaF3 murinas normalmente necesitan interleucina-3 (IL-3) para sobrevivir. Se obtuvieron células BaF3 de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemania) y se mantuvieron a 37 °C en medio RPMI-1640 (Invitrogen) con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (Sigma) y 1,0 ng/ml de IL-3 murina (R & D Systems).

Para determinar si la expresión de un polipéptido de fusión FIG-ROS de la invención podría permitir que las células BaF3 sobrevivieran sin IL-3, se transdujeron células BaF3 con los retrovirus descritos en el Ejemplo 4 codificante de FIG-ROS (L) y FIG-ROS (S). Además, también se generaron retrovirus codificantes de FIG-ROS (L) a partir de U118MG y se usaron para transducir células BaF3.

Como se muestra en la Fig. 10, FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) y FIG-ROS (L) de U118MG se expresaron de forma estable en células BaF3 cultivadas con o sin IL-3. De hecho, como se muestra en la Fig. 11, se encontró que la presencia de FIG-ROS (L) o FIG-ROS (S) permitió que las células BaF3 crecieran en ausencia de IL-3. Curiosamente, las células BaF3 que expresaban FIG-ROS (S) crecieron a un ritmo más rápido que las BaF3 que expresaban FIG-ROS (L).

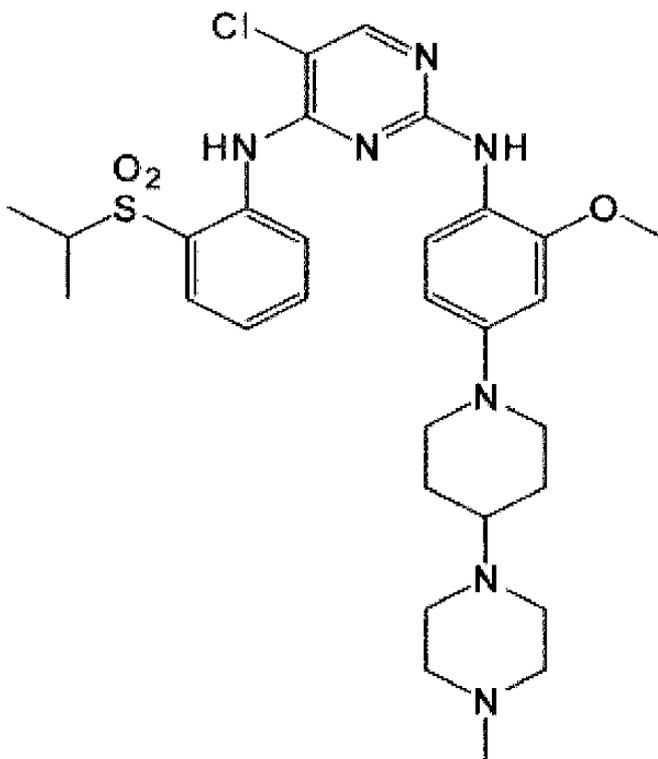
A continuación, se realizó un ensayo de quinasa *in vitro* para determinar si la parte de ROS quinasa de los polipéptidos de fusión FIG-ROS era activa. Los lisados celulares de células BaF3 transducidas en FIG-ROS se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-marcador de Myc (que desplaza los polipéptidos de fusión FIG-ROS marcados con Myc). El complejo inmune ROS retirado se lavó 3 veces con tampón de lisis celular, seguido

- por el tampón de quinasa (Cell Signaling Technology). Las reacciones de quinasa se iniciaron volviendo a suspender el complejo inmune de ROS en 25 ul de tampón de quinasa que contiene ATP 50 uM, 0,2 uCi/ul de [gamma32p] ATP, con 1 mg/ml de Poli (EY, 4: 1). Las reacciones se detuvieron detectando el cóctel de reacción en papeles de filtro p81. A continuación, se lavaron las muestras y se ensayaron para determinar la actividad quinasa por detección con un contador de centelleo. Como se muestra en la Fig. 12, aunque tanto FIG-ROS (L) como FIG-ROS (S) pueden fosforilar su sustrato, FIG-ROS (S) es más potente que FIG-ROS (L). En otras palabras, FIG-ROS (S) tiene una actividad quinasa mucho más alta que FIG-ROS (L). La carga igual de los carriles se muestra en el análisis de transferencia Western de los complejos inmunes de ROS usando un anticuerpo específico de ROS (véase la Fig. 12, panel inferior).
- 5
- 10 La mayor potencia de FIG-ROS (S) en comparación con FIG-ROS (L) coincide con los datos del ensayo de agar blando (véase la Fig. 7) y el ensayo de crecimiento independiente de IL-3 (véase la Fig. 11).

EJEMPLO 9

Sensibilidad de FIG-ROS (L) y FIG-ROS (S) a TAE-684

La molécula pequeña, TAE-684, una 5-cloro-2,4-diaminofenilpirimidina, que tiene la estructura:



- 15 y se ha demostrado que inhibe la ALK quinasa. Galkin, *et al.*, *Proc. National Acad. Sci* 104(1) 270-275, 2007.
- En este ejemplo, se determinó si TAE-684 también inhibía el polipéptido de fusión FIG-ROS. Para ello, se obtuvieron células BaF3 y Karpas 299 de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemania). Las células BaF3 se mantuvieron como se ha descrito anteriormente y se cultivaron células Karpas 299 (una estirpe celular de linfoma) en RPMI-1640 con FBS al 10 %.
- 20 Las células BaF3 se transdujeron con retrovirus codificante de FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) o FLT-3ITD (la mutación de duplicación en tándem interna en FLT3 causa leucemia AML) y se seleccionaron para el crecimiento independiente de IL3. Se usaron células Karpas 299, que expresan NPM-ALK, como control positivo.
- Se realizó un ensayo de MTS usando la el reactivo CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega. N.º de catálogo G3582). En resumen, se sembraron 1×10^5 células/pocillo en una placa de 24 pocillos en 1 ml de medio que incluía TAE-684 0 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM o 1000 nM. Después de 72 horas, se añadieron 20 ul del reactivo CellTiter 96 Aqueous One Solution a cada pocillo de una placa de ensayo de 96 pocillos (fondo plano) y a continuación se añadieron 100 ul de células cultivadas con o sin tratamiento. Se usaron pocillos solo para medios como controles. La placa de 96 pocillos se incubó durante 1-4 horas a 37 °C, y luego se realizó el recuento de las células viables leyendo la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas de 96 pocillos.
- 30 Como se muestra en la Fig. 13, las células BaF3 transducidas con retrovirus que expresan uno de los polipéptidos

FIG-ROS dejaron de crecer en presencia de TAE-684. Curiosamente, FIG-ROS (S) es menos susceptible a TAE-684 que FIG-ROS (L). Las células Karpas 299 también respondieron (es decir, dejaron de crecer) en presencia de TAE-684, lo que era de esperar, ya que expresan ALK, y TAE-684 inhibe la ALK quinasa. Las células BaF3 transducidas con FLT3/ITD no fueron susceptibles a TAE-684.

5 A continuación, se revisó el mecanismo de muerte de las células BaF3 y Karpas 299 midiendo el porcentaje de células positivas en caspasa 3 escindidas mediante ensayo de citometría de flujo usando caspasa 3 escindida como marcador de apoptosis. Estos resultados se obtuvieron usando el protocolo disponible para el público en general de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA).

10 Como se muestra en la Fig. 14, la presencia de TAE-684 hizo que las células BaF3 que expresan la FIG-ROS (S) o FIG-ROS (L) murieran por apoptosis. Curiosamente, las células Karpas 299, que dejan de crecer en presencia de TAE-684, no murieron por apoptosis - simplemente sufrieron la detección del ciclo celular. Por lo tanto, el mecanismo mediante el cual TAE-684 inhibe los polipéptidos de fusión FIG-ROS es probablemente diferente del mecanismo mediante el que TAE-684 inhibe la ALK quinasa.

15 Para identificar mejor el mecanismo de acción de TAE-684 sobre los polipéptidos de fusión FIG-ROS de la invención, las cuatro estirpes celulares (es decir, células Karpas 299 y células BaF3 transducidas con retrovirus que codifican FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) y FLT-3ITD) se sometieron a análisis de transferencia Western después del tratamiento con TAE-684 0, 10, 50 o 100 nM durante tres horas. Todos los anticuerpos eran de Cell Signaling Technology, Inc.

20 Como se muestra en la Fig. 15, la fosforilación tanto de FIG-ROS (S) como de FIG-ROS (L) en células BaF3 que expresan FIG-ROS (S) y FIG-ROS (L) fue inhibida por TAE-684. Además, la fosforilación de STAT3, AKT, y ERK, y Shp2 se inhibieron en FIG-ROS (S) y FIGOS (L) que expresan células BaF3. La fosforilación de STAT3, AKT y ERK, y Shp2 no se vio afectada en las células BaF3 transducidas con el retrovirus FLT-3ITD. TAE-684 también inhibió la fosforilación de ALK y ERK en células Karpas 299. Dado que ROS, ALK, LTK, InsR e IGF1R pertenecen a la misma familia de tirosina quinasa, pueden compartir una estructura similar en el dominio quinasa. Los inhibidores de quinasa o anticuerpos diseñados contra ALK, LTK, InsR e IGF1R pueden tener efectos terapéuticos contra la ROS quinasa.

EJEMPLO 10

Detección de la expresión de ROS mutante en una muestra de cáncer humano usando un ensayo FISH

30 La presencia de un polinucleótido de fusión ROS (p. ej., un FIG-ROS(L), FIG-ROS (S), FIG-ROS (XL), SLC34A2-ROS(S), SLC34A2-ROS (VS), SLC34A2-ROS (L) o CD74-ROS) en cáncer de hígado (p. ej., en un colangiocarcinoma), cáncer de páncreas, cáncer de riñón o cáncer testicular se detecta usando un ensayo de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH). Dichos ensayos FISH son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Verma *et al.* "Human Chromosomes: A Manual de Basic Techniques", Pergamon Press, Nueva York, N. Y. (1988).

35 Para ello, se examinan muestras de tumores humanos introducidas en parafina. Algunos tejidos que se examinan incluyen cánceres de hígado, páncreas, testículo y de riñón, en particular, cánceres que afectan a los conductos de todos estos tejidos.

40 Para analizar las redistribuciones que implican el gen de ROS, se diseñó una sonda de escisión de dos colores. Como se muestra en la Figura 16, varias sondas BAC rodean los genes de FIG y ROS en el cromosoma 6. Aunque estas sondas son ideales para identificar las translocaciones entre el gen de FIG (también conocido como el gen GOPC- véase la Fig. 16) y el gen de ROS, estas sondas también pueden usarse para identificar otra translocación del gen de ROS.

45 Para estos estudios, se diseñó una sonda proximal (clon BAC RP1-179P9) y dos sondas distales (clon BAC RP11-323O17, RP1-94G16) (estando todas ellas disponibles en el mercado, p. ej., en Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, como los n.º de catálogo RPC11.C y RPC111.C). La sonda proximal puede marcarse con Spectrum Orange dUTP y la sonda distal puede marcarse con Spectrum Green dUTP, el marcaje de las sondas mediante traducción de muescas y FISH de interfase usando secciones de tejido FFPE pueden realizarse según las instrucciones del fabricante (Vysis Inc., Downers Grove, IL) con las siguientes modificaciones. En resumen, se rehidrataron las secciones de tejido embebidas en parafina y se sometieron a pretratamiento primero en HCl 0,2 N durante 20 minutos seguido de tiocianato de sodio 1 M a 80 °C durante 30 min.

50 Después de un breve lavado, las secciones se digieren con proteasa (8 mg de Pepsina, 2000-3000 U/mg) durante 45-60 minutos a 37 °C y luego se fijaron en NBF al 10 % y se deshidrataron. A continuación, se carga el conjunto de sondas en las secciones y se incubaba a 94 °C durante 3 min con el fin de desnaturalizar la sonda y el cromosoma diana. Después de la desnaturalización, se incuban los portaobjetos a 37 °C durante un mínimo de 18 horas. Después del lavado, se aplicará 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; mg/ml) en un medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para la contratación nuclear.

La sonda de redistribución de FIG-ROS contendrá tres sondas marcadas de forma diferente. Dos de estas sondas

(RP11-323O17, RP1-94G16) se dirigen a la zona de eliminación entre los puntos de corte del gen de FIG y el gen de ROS, y la otra sonda (RP1-179P9) se dirige a la parte restante del gen de ROS (véase la Figura 16). Las secuencias de los intrones que contienen los puntos de corte de los genes de FIG y ROS se proporcionan en SEQ ID NO: 5 (intrón 3 de FIG), SEQ ID NO: 6 (intrón 7 de FIG), SEQ ID NO: 7 (intrón 33 de ROS), SEQ ID NO: 8 (intrón 34 de ROS) y SEQ ID NO: 26 (intrón 31 de ROS). Las sondas se diseñan basándose en los puntos de corte identificados en el Ejemplo 2. Cuando se hibrida, la región de ROS nativa (es decir, de tipo silvestre) aparecerá como una señal de fusión naranja/verde (que puede aparecer amarilla bajo un microscopio), mientras que la redistribución en este locus (como ocurre en la proteína de fusión FIG-ROS) producirá señales naranjas, ya que se han eliminado las zonas diana para las sondas verdes.

10 Para las redistribuciones del gen de ROS con CD74 (en el cromosoma 5) o SLC34A2 (en el cromosoma 4), debido a que estos genes se encuentran en cromosomas distintos del cromosoma 6, aparecerá la región ROS nativa (es decir, de tipo silvestre o no reordenada) como una señal de fusión naranja/verde (que puede parecer amarilla bajo un microscopio), mientras que la redistribución en este locus (como ocurre en las proteínas de fusión SLC34A2-ROS y las proteínas de fusión CD74-ROS) producirá una señal naranja separada (en el cromosoma 6) y señal verde separada (en el cromosoma 5 para CD74 y el cromosoma 4 para SLC34A2).

15 El análisis de FISH revelará probablemente una baja incidencia de translocaciones de los genes se ROS en la población de muestra que tiene cáncer de hígado (p. ej., en un colangiocarcinoma), cáncer de páncreas, cáncer de riñón o cáncer testicular. Sin embargo, se predice que un subconjunto de los cánceres estudiados contendrá una translocación de ROS. Estos cánceres que contienen la translocación de FIG-ROS se identifican como aquellos
20 cánceres que probablemente responden a un inhibidor de ROS. En otras palabras, se prevé que las células del cáncer, tras el tratamiento (o contacto) con un inhibidor de ROS, muestren retraso del crecimiento, inhibición del crecimiento (es decir, dejan de crecer) o mueran (p. ej., mediante apoptosis) en comparación con las células cancerosas no tratadas (es decir, células no puestas en contacto con el inhibidor de ROS).

EJEMPLO 11

IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ROS MUTANTE EN LOS CÁNCERES DE HÍGADO HUMANOS

25 A continuación, se realizaron estudios para determinar si la expresión de ROS podría observarse en muestras de cánceres de hígado humanos. Los dos tipos más comunes de cáncer de hígado son el carcinoma hepatocelular (HCC), que representa el 80 % de todos los casos y el colangiocarcinoma (CCA, o cáncer de conducto biliar), que representa el 10-15 % de las neoplasias hepatobiliares (Blechacz et al., *Hepatology* 48:308-321, 2008 y de Groen, P.C., *N Engl J Med* 341:1368-1378, 1999). Para estos estudios, se usó un anticuerpo específico de ROS (clon n.º D4D6) que se unió específicamente al extremo C-terminal de ROS. Dichos anticuerpos se encuentran disponibles en el mercado (véase, p. ej., el anticuerpo Ros (C-20), n.º de catálogo sc-6347 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

35 Para los estudios sobre colangiocarcinoma, se obtuvieron diecinueve bloques y placas de tejido introducidos en parafina de colangiocarcinoma humano de BioChain Institute, Inc., Hayward, CA, Folio Biosciences, Columbus, OH y Analytical Biological Services, Inc., Wilmington, DE. Las secciones tisulares de 4-6 µm se desparafinaron a través de tres cambios de xileno durante 5 minutos cada uno, luego se rehidrataron a través de dos cambios de etanol al 100 % y 2 cambios de etanol al 95 %, cada uno durante 5 minutos.

40 A continuación, se aclararon los portaobjetos desparafinados durante 5 minutos cada vez en tres cambios de diH₂O, y después se sometieron a recuperación de antígeno en una cámara de declorcimiento (Biocare Medical, Concord, CA). Los portaobjetos se sumergieron en 250 ml de EDTA 1,0 mM, pH 8,0 en un soporte de 24 portaobjetos de Tissue Tek. La cámara de declorcimiento se llenó con 500 ml de diH₂O, se colocó el soporte de portaobjetos en la cámara tocando el blindaje térmico y se realizó la recuperación con los siguientes ajustes establecidos por el fabricante: SP1 125 °C durante 30 segundos y SP2 90 °C durante 10 segundos. Se enfriaron los portaobjetos en el
45 banco durante 10 minutos, se aclararon en diH₂O, se sumergieron en H₂O₂ al 3 % durante 10 minutos y después se lavaron dos veces en diH₂O.

Tras bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente en solución salina tamponada con Tris + Tween-20 al 0,5 % (TBST)/suero de cabra al 5 % en una cámara humidificada, se incubaron las placas durante la noche a 4 °C con mAb de conejo Ros (D4D6) XP™ a 0,19 µg/ml diluido en diluyente de anticuerpos SignalStain® (catálogo n.º 8112 Cell Signalling Technology, Danvers, MA). Después de lavar tres veces en TBST, se realizó la detección con el reactivo de detección SignalStain® Boost IHC (HRP, Conejo) (catálogo n.º 8114 Cell Signalling Technology, Danvers, MA) con una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara humidificada.

55 Tras lavar tres veces en TBST para retirar el reactivo de detección de SIGNALStain® Boost IHC, se expusieron, a continuación, los portaobjetos a NovaRed (Vector Laboratories, Burlingame, CA) preparado según las instrucciones del fabricante. Se revelaron los portaobjetos durante 1 minuto y después se aclararon en diH₂O. Se sometieron los portaobjetos a una contraincubación incubando en hematoxilina (Ready to use Invitrogen (Carlsbad, CA) catálogo n.º 00-8011) durante 1 minuto, se enjuagaron durante 30 segundos en diH₂O, se incubaron durante 20 segundos en un reactivo de coloración azul (Richard Allan Scientific, Kalamazoo, MI (una empresa Thermo Scientific), Catálogo n.º

- 7301) y, finalmente, se lavaron durante 30 segundos en diH₂O. Se deshidrataron los portaobjetos en 2 cambios de etanol al 95 % durante 20 segundos cada uno y 2 cambios de etanol al 100 % durante 2 minutos cada uno. Se aclararon los portaobjetos en 2 cambios de xileno durante 20 segundos cada uno, luego se secaron al aire. Se montaron los cubreobjetos usando VectaMount (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se secaron al aire los portaobjetos, luego se evaluaron bajo el microscopio.
- 5
- De las diecinueve muestras ensayadas, seis muestras se tiñeron positivas para la unión del anticuerpo específico para ROS. La Figura 17 muestra una imagen representativa del portaobjetos de una muestra de tejido de CCA que se tiñó positiva para la expresión de ROS. Este hallazgo es notable, porque ROS no se expresa en el tejido normal del conducto biliar y tampoco se expresa en el tejido hepático normal.
- 10
- Se espera que el análisis de secuenciación de las muestras que muestran tinción fuerte con el anticuerpo específico de ROS revele la presencia de la expresión de ROS mutante (p. ej., sobreexpresión de ROS de tipo silvestre en el tejido de cáncer de conducto biliar cuando no hay en el tejido de conducto biliar normal) o la presencia de un polipéptido ROS truncado o una proteína de fusión ROS (p. ej., un polipéptido de fusión FIG-ROS).
- 15
- Para los estudios sobre carcinoma hepatocelular, se deparafinizaron 23 matrices de tejidos de HCC humanos embebidas en parafina seccionadas a 4 µm mediante tres cambios de xileno durante 5 minutos cada uno, luego se rehidrataron a través de dos cambios de etanol al 100 % y 2 cambios de etanol al 95 % minutos, cada uno de 5 minutos. A continuación, se aclararon los portaobjetos durante 5 minutos cada vez en tres cambios de diH₂O, y después se sometieron a recuperación de antígeno en una cámara de declocimiento (Biocare Medical, Concord, CA) de la siguiente manera. Los portaobjetos se sumergieron en 250 ml de EDTA 1,0 mM, pH 8,0 en un soporte de 20
- 20
- 24 portaobjetos de Tissue Tek. La cámara de declocimiento se llenó con 500 ml de diH₂O, se colocó el soporte de portaobjetos en la cámara tocando el blindaje térmico y se realizó la recuperación con los siguientes ajustes establecidos por el fabricante: SP1 125 °C durante 30 segundos y SP2 90 °C durante 10 segundos. Se enfriaron los portaobjetos en el banco durante 10 minutos, se aclararon en diH₂O, se sumergieron en H₂O₂ al 3 % durante 10 minutos y después se lavaron dos veces en diH₂O.
- 25
- Tras bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente en solución salina tamponada con Tris + Tween-20 al 0,5 % (TBST)/suero de cabra al 5 % en una cámara humidificada, se incubaron las placas durante la noche a 4 °C con mAb de conejo Ros (D4D6) XP™ a 0,19 µg/ml diluido en diluyente de anticuerpos SignalStain® (n.º 8112 Cell Signalling Technology, Danvers, MA). Después de lavar tres veces en TBST, se realizó la detección con el reactivo de detección SignalStain® Boost IHC (HRP, Conejo) (n.º 8114 Cell Signalling Technology, Danvers, MA) con una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara humidificada.
- 30
- Tras lavar tres veces en TBST, se expusieron los portaobjetos a NovaRed (Vector Laboratories, Burlingame, CA) preparado según las instrucciones del fabricante. Se revelaron los portaobjetos durante 1 minuto y después se aclararon en diH₂O. Se sometieron los portaobjetos a una contratinción incubando en hematoxilina (Ready to use Invitrogen, n.º 00-8011) durante 1 minuto, se enjuagaron durante 30 segundos en diH₂O, se incubaron durante 20
- 35
- 35 segundos en un reactivo de coloración azul (Richard Allan Scientific n.º 7301) y, finalmente, se lavaron durante 30 segundos en diH₂O. Se deshidrataron los portaobjetos en 2 cambios de etanol al 95 % durante 20 segundos cada uno y 2 cambios de etanol al 100 % durante 2 minutos cada uno. Se aclararon los portaobjetos en 2 cambios de xileno durante 20 segundos cada uno, luego se secaron al aire. Se montaron los cubreobjetos usando VectaMount (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se secaron al aire los portaobjetos, luego se evaluaron bajo el microscopio.
- 40
- De las veintitrés muestras ensayadas, una muestra fue fuertemente positiva para la tinción (es decir, unión) por el anticuerpo específico de ROS y nueve casos mostraron tinción débil a moderada. La Figura 18 muestra una imagen representativa de un portaobjetos de una muestra de tejido de HCC que se tiñó moderadamente positiva para la expresión de ROS. Este hallazgo es notable, porque ROS no se expresa en el tejido normal del conducto biliar y tampoco se expresa en el tejido hepático normal.
- 45
- Se espera que el análisis de secuenciación de las muestras que muestran tinción fuerte con el anticuerpo específico de ROS revele la presencia de la expresión de ROS mutante (p. ej., sobreexpresión de ROS de tipo silvestre en el tejido de carcinoma hepatocelular cuando no hay en el tejido hepático) o la presencia de un polipéptido ROS truncado o una proteína de fusión ROS (p. ej., un polipéptido de fusión FIG-ROS).
- 50
- Para determinar si el anticuerpo ROS usado era capaz de unirse a ROS mutante en estos tejidos hepáticos, se realizó un ensayo IHC en células HCC78 (un cáncer de pulmón no microcítico conocido por expresar un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS) en presencia o ausencia de un péptido ROS competidor.
- 55
- Se realizó la IHC como se describió anteriormente para las muestras de tejido de HCC y CCA. En resumen, se desparafinaron los sedimentos de células HCC78 introducidos en parafina y se rehidrataron a través de tres cambios de xileno y etanol graduado, luego se aclararon en diH₂O. Se sometieron los portaobjetos a recuperación de antígeno en EDTA 1,0 mM, pH 8,0 en el microondas. Después de bloquear durante 1 hora en TBST/suero de cabra al 5 %, se incubaron los portaobjetos durante la noche a 4 °C con mAb de conejo Ros (D4D6) XP™ a 0,19 µg/ml en ausencia de péptido o en presencia de uno de 13 péptidos ROS diferentes a 1,9 µg/ml. Los péptidos ROS fueron los siguientes:

- Número del péptido: M09-6291
 Nombre del péptido: ROS-1
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGCGQGEEKSEG
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 5 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6300
 Nombre del péptido: ROS-10
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGSGKPEGLNYA
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 10 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6301
 Nombre del péptido: ROS-11
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGGLNYACLTHS
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 15 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6302
 Nombre del péptido: ROS-12
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGCLTHSGYGDG
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 20 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6303
 Nombre del péptido: ROS-13
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGTHSGYGDGSD
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 25 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6292
 Nombre del péptido: ROS-2
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGEKSEGPLGSQ
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 30 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6293
 Nombre del péptido: ROS-3
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGPLGSQESESC
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 35 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6294
 Nombre del péptido: ROS-4
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGESESCGLRKE
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 40 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6295
 Nombre del péptido: ROS-5
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGGLRKEEKEPH
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 45 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6296
 Nombre del péptido: ROS-6
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGEKEPHADKDF
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 50 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6297
 Nombre del péptido: ROS-7
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGADKDFCQEKQ
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 55 Escala de la síntesis (μmol): 5
- Número del péptido: M09-6298
 Nombre del péptido: ROS-8

Secuencia del péptido: (biotina)AGAGCQEKQVAYCP
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 Escala de la síntesis (μmol): 5

5 Número del péptido: M09-6299
 Nombre del péptido: ROS-9
 Secuencia del péptido: (biotina)AGAGVAYCPSGKPE
 Extremo carboxilo del péptido: CONH2
 Escala de la síntesis (μmol): 5

10 Tras lavar, se realice la detección con reactivo de detección de IHC SignalStain® Boost (HRP, Conejo) n.º 8114 y NovaRed (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

15 Los resultados muestran que solo el péptido 9 fue capaz de competir por la unión del anticuerpo fuera del portaobjetos de IHC. La Figura 19A muestra un portaobjetos de IHC con la adición del péptido ROS-1, y la Figura 19B muestra un portaobjetos de IHC con la adición del péptido ROS-9. Por lo tanto, la secuencia de ROS-9, en concreto, AGAGVAYCPSGKPE, está dentro del fragmento de ROS quinasa específicamente unido al anticuerpo usado en estos estudios. Dado que esta secuencia aparece dentro del dominio quinasa de la ROS quinasa, estos estudios sugieren con fuerza que los tejidos de CCA y HCC que se tiñeron positivos para la unión con el anticuerpo específico de ROS expresaban el dominio quinasa de ROS.

La descripción se puede describir con mayor detalle mediante las siguientes cláusulas:

20 1. Un polipéptido de fusión FIG-ROS (S) purificado, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 17.

2. Un polinucleótido de fusión FIG-ROS (S) purificado, en donde dicho polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 16.

3. Un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS.

25 4. El agente de unión de la cláusula 3, en donde el agente de unión se une específicamente a una unión de fusión entre una parte FIG y una parte ROS en dicho polipéptido de fusión FIG-ROS.

5. El agente de unión de la cláusula 4, en donde la unión de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AGSTLP, LQVWHR y LQAGVP.

30 6. El agente de unión de la cláusula 3, en donde el polipéptido de fusión FIG-ROS se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), un polipéptido de fusión FIG-ROS (L) y un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL).

7. El agente de unión de la cláusula 3, en donde el agente de unión se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo y un péptido AQUA.

35 8. Una sonda nucleotídica para detectar un polinucleótido de fusión FIG-ROS (S) o un polinucleótido de fusión FIG-ROS (XL), en donde dicha sonda se hibrida con dicho polinucleótido de fusión FIG-ROS (S) o a un polinucleótido de fusión FIG-ROS (XL) en condiciones rigurosas.

9. Un método de detección de una translocación del gen de FIG-ROS en una muestra biológica, comprendiendo dicho método la puesta en contacto de una muestra biológica con un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS, en donde la unión específica de dicho agente de unión a dicha muestra biológica indica una translocación del gen de FIG-ROS en dicha muestra biológica.

40 10. Un método de detección de una translocación del gen de FIG-ROS en una muestra biológica, comprendiendo dicho método la puesta en contacto de una muestra biológica con una sonda nucleotídica que se hibrida con un polinucleótido de fusión FIG-ROS en condiciones rigurosas, en donde la hibridación de dicha sonda nucleotídica a dicha muestra biológica indica una translocación del gen de FIG-ROS en dicha muestra biológica.

45 11. Un método de diagnóstico de un paciente que tiene un cáncer o cáncer sospechoso caracterizado por una ROS quinasa, en donde dicho cáncer o cáncer sospechoso no es un cáncer ni cáncer sospechoso seleccionado del grupo que consiste en carcinoma pulmonar no microcítico y glioblastoma, comprendiendo dicho método la puesta en contacto de una muestra biológica de dicho cáncer o cáncer sospechoso, comprendiendo dicha muestra biológica al menos un polipéptido, con un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS mutante, en donde la unión específica de dicho agente de unión a al menos un polipéptido en dicha muestra biológica identifica a dicho paciente como aquel que tiene un cáncer o un cáncer sospechoso caracterizado por una ROS quinasa.

50 12. Un método de identificación de un cáncer o un cáncer sospechoso que es probable que responda a un inhibidor de ROS, en donde dicho cáncer o cáncer sospechoso no es un cáncer ni un cáncer sospechoso seleccionado del grupo que consiste en carcinoma pulmonar no microcítico y glioblastoma, comprendiendo dicho método la puesta en

- 5 contacto de una muestra biológica de dicho cáncer o cáncer sospechoso, comprendiendo dicha muestra biológica al menos un polipéptido con un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS mutante, en donde la unión específica de dicho agente de unión a al menos un polipéptido en dicha muestra biológica identifica dicho cáncer o cáncer sospechoso como un cáncer o cáncer sospechoso que es probable que responda a un inhibidor de ROS.
13. El método de la cláusula 11 o 12, en donde dicho polipéptido ROS mutante es polipéptido ROS de tipo silvestre expresado de forma aberrante.
14. El método de la cláusula 11 o 12, en donde dicho polipéptido ROS mutante se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido ROS truncado y un polipéptido de fusión ROS.
- 10 15. El método de la cláusula 14, en donde el polipéptido de fusión ROS se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), un polipéptido de fusión FIG-ROS (L), un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL), un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS (S), un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS (L), un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS (VS) y un polipéptido de fusión CD74-ROS.
- 15 16. El método de la cláusula 11 o 12, en donde el agente de unión se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o un péptido AQUA.
- 20 17. Un método de diagnóstico de un paciente que tiene un cáncer o cáncer sospechoso caracterizado por una ROS quinasa, en donde dicho cáncer o cáncer sospechoso no es un cáncer ni un cáncer sospechoso seleccionado del grupo que consiste en carcinoma pulmonar no microcítico y glioblastoma, comprendiendo dicho método la puesta en contacto de una muestra biológica de dicho cáncer o cáncer sospechoso, comprendiendo dicha muestra biológica al menos una molécula de ácido nucleico, con una sonda que se hibrida en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en un polinucleótido de fusión FIG-ROS, un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS, un polipéptido de fusión CD74-ROS y un polinucleótido ROS truncado, y en donde la hibridación de dicha sonda con al menos una molécula de ácido nucleico en dicha muestra biológica identifica que dicho paciente tiene un cáncer o un cáncer sospechoso caracterizado por una ROS quinasa.
- 25 18. Un método de identificación de un cáncer o un cáncer sospechoso que es probable que responda a un inhibidor de ROS, en donde dicho cáncer o cáncer sospechoso no es un cáncer ni un cáncer sospechoso seleccionado del grupo que consiste en carcinoma pulmonar no microcítico y glioblastoma, comprendiendo dicho método la puesta en contacto de una muestra biológica de dicho cáncer o cáncer sospechoso, comprendiendo dicha muestra biológica al menos una molécula de ácido nucleico, con una sonda que se hibrida en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en un polinucleótido de fusión FIG-ROS, un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS, un polipéptido de fusión CD74-ROS y un polinucleótido ROS truncado, y en donde la hibridación de dicha sonda con al menos una molécula de ácido nucleico en dicha muestra biológica identifica que dicho cáncer o cáncer sospechoso como un cáncer o cáncer sospechoso que es probable que responda a un inhibidor de ROS.
- 30 19. El método de la cláusula 17 o 18, en donde el polinucleótido de fusión FIG-ROS codifica un polipéptido de fusión seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), un polipéptido de fusión FIG-ROS (L) y un polipéptido de fusión FIG-ROS (XL).
- 35 20. El método de la cláusula 17 o 18, en donde el polinucleótido de fusión SCL34A2-ROS codifica un polipéptido de fusión seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de fusión SCL34A2-ROS (S), un polipéptido de fusión SCL34A2-ROS (L) y un polipéptido de fusión SCL34A2-ROS (VS).
- 40 21. El método de la cláusula 11, 12, 17 o 18, en donde dicho cáncer o cáncer sospechoso se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de riñón, un cáncer de hígado, un cáncer de páncreas y un cáncer de testículo.
22. El método de la cláusula 11, 12, 17 o 18, en donde el cáncer es de un ser humano.
- 45 23. El método de la cláusula 12 o 18, en donde, el inhibidor de ROS se selecciona del grupo que consiste en un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS, un agente de unión que se une específicamente a un polipéptido ROS truncado, un ARNip dirigido a un polinucleótido de fusión FIG-ROS y un ARNip dirigido a un polinucleótido ROS truncado.
24. El método de la cláusula 12 o 18, en donde el inhibidor de ROS es un inhibidor de una quinasa seleccionada del grupo que consiste en una ALK quinasa, una LTK quinasa, un receptor de insulina y un receptor de IGF1.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Cell Signaling Technology. Inc.	
	<120> Expresión de ROS mutante en el cáncer humano	
5	<130> 28126 (CST-281)	
	<140> PCT/US2010/024109	
	<141> 25-03-2010	
10	<150> 61/207,484	
	<151> 12-02-2009	
	<160> 61	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 2637	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Nucleótido Sintético	
25	<400> 1	
	atgtcggcgg gcggtccatg cccagcagca gccggagggg gccaggggg cgcctcctgc	60
	tccgtggggg cccctggcgg ggtatccatg ttccgggtggc tggaggtgct ggagaaggag	120
	ttcgacaaag cttttgtgga tgtggatctg ctctctgggag agatcgatcc agaccaagcg	180
	gacatcactt atgagggggc acagaagatg accagcctga gctcctgctt tgcacagctt	240
	tgccacaaag cccagtctgt gtctcaaatc aaccacaagc tggaggcaca gttggtggat	300
	ctgaaatctg aactgacaga aaccacaagc gagaaagtg ttttggagaa agaagtacat	360
	gatcagcttt tacagctgca ctctattcag ctgcagcttc atgctaaaac tgggtcaaagt	420
	gctgactctg gtaccattaa ggcaaaattg gaaagagagc ttgaggcaaa caaaaaagaa	480
	aaaatgaaag aagcacaact tgaagctgaa gtgaaattgt tgagaaaaga gaatgaagcc	540
	cttcgtagac atatagctgt tctccaggct gaagtatatg gggcgagact agctgccaag	600
	tacttggata aggaactggc aggaagggtc caacagatac aattgctagg acgagatatg	660
	aagggacctg ctcatgataa gctttggaac caattagaag ctgaaataca tttgcatcgt	720
	cacaaaaactg tgatccgagc ctgcagagga cgtaatgact tgaaacgacc aatgcaagca	780
	ccaccaggcc atgatcaaga ttccctaaag aaaagccaag gtgttgggtcc aattagaaaa	840
	gttctcctcc ttaaggaaga tcatgaaggc cttggcattt caattacagg tgggaaagaa	900
	catggtgttc caatcctcat ctctgagatc catccggggc aacctgctga tagatgcgga	960
	gggctgcacg ttggggatgc tattttggca gtcaacggag ttaacctaaag ggacacaaag	1020
	cataaagaag ctgtaactat tctttctcag cagagaggag agattgaatt tgaagtagtt	1080

ES 2 637 174 T3

tatgtggctc ctgaagtgga ttctgatgat gaaaacgtag agtatgaaga tgagagtgga 1140
 catcgttacc gtttgtacct tgatgagtta gaaggagggtg gtaaccctgg tgctagtgtc 1200
 aaagacacaa gtggggaaat caaagtatta caagtctggc atagaagatt aaagaatcaa 1260
 aaaagtgcc aaggaaggggt gacagtgctt ataaacgaag acaaagagt ggctgagctg 1320
 cgaggtctgg cagccggagt aggcctggct aatgcctgct atgcaataca tactcttcca 1380
 acccaagagg agattgaaaa tcttctgccc ttcctcggg aaaaactgac tctgcgtctc 1440
 ttgctgggaa gtggagcctt tggagaagtg tatgaaggaa cagcagtgga catcttagga 1500
 gttggaagtg gagaaatcaa agtagcagtg aagactttga agaagggttc cacagaccag 1560
 gagaagattg aattcctgaa ggaggcacat ctgatgagca aatttaatca tcccaacatt 1620
 ctgaagcagc ttggagtttg tctgctgaat gaacccaat acattatcct ggaactgatg 1680
 gagggaggag accttcttac ttatttgcgt aaagccggg tggcaacgtt ttatggtcct 1740
 ttactcacct tggttgacct tgtagacctg tgtgtagata tttcaaaagg ctgtgtctac 1800
 ttggaacgga tgcatttcat tcacagggat ctggcagcta gaaattgcct tgtttccgtg 1860
 aaagactata ccagtccacg gatagtgaag attggagact ttggactcgc cagagacatc 1920
 tataaaaatg attactatag aaagagaggg gaagcctgc tcccagttcg gtggatggct 1980
 ccagaaagt ttgatggatg aatcttcaact actcaatctg atgtatggtc ttttgaatt 2040
 ctgatttggg agattttaac tcttggctcat cagccttacc cagctcattc caacctgat 2100
 gtgttaaact atgtgcaaac aggagggaga ctggagccac caagaaattg tcctgatgat 2160
 ctgtggaatt taatgaccca gtgctgggct caagaacccg accaaagacc tacttttcat 2220
 agaattcagg acccaacttca gttattcaga aattttttct taaatagcat ttataagtc 2280
 agagatgaag caaacaacag tggagtcata aatgaaagct ttgaaggatga agatggcgat 2340
 gtgatttgtt tgaattcaga tgacattatg ccagttgctt taatggaaac gaagaaccga 2400
 gaagggttaa actatatggt acttgctaca gaatgtggcc aaggatgaaga aaagtctgag 2460
 ggtcctctag gctcccagga atctgaatct tgtggtctga ggaagaaga gaaggaacca 2520
 catgcagaca aagatttctg ccaagaaaa caagtggctt actgcccttc tggcaagcct 2580
 gaagcctga actatgcctg totcactcac agtggatatg gagatgggtc tgattaa 2637

<210> 2
 <211> 878
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

10

<400> 2

ES 2 637 174 T3

Met Ser Ala Gly Gly Pro Cys Pro Ala Ala Ala Gly Gly Gly Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ala Ser Cys Ser Val Gly Ala Pro Gly Gly Val Ser Met Phe Arg
20 25 30

Trp Leu Glu Val Leu Glu Lys Glu Phe Asp Lys Ala Phe Val Asp Val
35 40 45

Asp Leu Leu Leu Gly Glu Ile Asp Pro Asp Gln Ala Asp Ile Thr Tyr
50 55 60

Glu Gly Arg Gln Lys Met Thr Ser Leu Ser Ser Cys Phe Ala Gln Leu
65 70 75 80

Cys His Lys Ala Gln Ser Val Ser Gln Ile Asn His Lys Leu Glu Ala
85 90 95

Gln Leu Val Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Glu Thr Gln Ala Glu Lys
100 105 110

Val Val Leu Glu Lys Glu Val His Asp Gln Leu Leu Gln Leu His Ser
115 120 125

Ile Gln Leu Gln Leu His Ala Lys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Ser Gly
130 135 140

Thr Ile Lys Ala Lys Leu Glu Arg Glu Leu Glu Ala Asn Lys Lys Glu
145 150 155 160

Lys Met Lys Glu Ala Gln Leu Glu Ala Glu Val Lys Leu Leu Arg Lys
165 170 175

Glu Asn Glu Ala Leu Arg Arg His Ile Ala Val Leu Gln Ala Glu Val
180 185 190

Tyr Gly Ala Arg Leu Ala Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Glu Leu Ala Gly
195 200 205

Arg Val Gln Gln Ile Gln Leu Leu Gly Arg Asp Met Lys Gly Pro Ala
210 215 220

His Asp Lys Leu Trp Asn Gln Leu Glu Ala Glu Ile His Leu His Arg
225 230 235 240

His Lys Thr Val Ile Arg Ala Cys Arg Gly Arg Asn Asp Leu Lys Arg
245 250 255

ES 2 637 174 T3

Pro Met Gln Ala Pro Pro Gly His Asp Gln Asp Ser Leu Lys Lys Ser
 260 265 270

Gln Gly Val Gly Pro Ile Arg Lys Val Leu Leu Leu Lys Glu Asp His
 275 280 285

Glu Gly Leu Gly Ile Ser Ile Thr Gly Gly Lys Glu His Gly Val Pro
 290 295 300

Ile Leu Ile Ser Glu Ile His Pro Gly Gln Pro Ala Asp Arg Cys Gly
 305 310 315 320

Gly Leu His Val Gly Asp Ala Ile Leu Ala Val Asn Gly Val Asn Leu
 325 330 335

Arg Asp Thr Lys His Lys Glu Ala Val Thr Ile Leu Ser Gln Gln Arg
 340 345 350

Gly Glu Ile Glu Phe Glu Val Val Tyr Val Ala Pro Glu Val Asp Ser
 355 360 365

Asp Asp Glu Asn Val Glu Tyr Glu Asp Glu Ser Gly His Arg Tyr Arg
 370 375 380

Leu Tyr Leu Asp Glu Leu Glu Gly Gly Gly Asn Pro Gly Ala Ser Cys
 385 390 395 400

Lys Asp Thr Ser Gly Glu Ile Lys Val Leu Gln Val Trp His Arg Arg
 405 410 415

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

Glu Asp Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Gly Leu Ala Ala Gly Val Gly
 435 440 445

Leu Ala Asn Ala Cys Tyr Ala Ile His Thr Leu Pro Thr Gln Glu Glu
 450 455 460

Ile Glu Asn Leu Pro Ala Phe Pro Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Leu
 465 470 475 480

Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly Thr Ala Val
 485 490 495

Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val Ala Val Lys Thr
 500 505 510

ES 2 637 174 T3

Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe Leu Lys Glu
 515 520 525
 Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile Leu Lys Gln Leu
 530 535 540
 Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu Glu Leu Met
 545 550 555 560
 Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg Met Ala Thr
 565 570 575
 Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val Asp Leu Cys Val
 580 585 590
 Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met His Phe Ile His
 595 600 605
 Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Val Lys Asp Tyr Thr
 610 615 620
 Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile
 625 630 635 640
 Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly Leu Leu Pro Val
 645 650 655
 Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile Phe Thr Thr Gln
 660 665 670
 Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu
 675 680 685
 Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr
 690 695 700
 Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp
 705 710 715 720
 Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg
 725 730 735
 Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe
 740 745 750
 Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn Asn Ser Gly

ES 2 637 174 T3

gaagtgtatg aaggaacagc agtggacatc ttaggagttg gaagtggaga aatcaaagta 780
gcagtgaaaga ctttgaagaa gggttccaca gaccaggaga agattgaatt cctgaaggag 840
gcacatctga tgagcaaatt taatcatccc aacattctga agcagcttgg agtttgtctg 900
ctgaatgaac cccaatacat tatcctggaa ctgatggagg gaggagacct tcttacttat 960
ttgcgtaaag cccggatggc aacgttttat ggtcctttac tcaccttggg tgaccttcta 1020
gacctgtgtg tagatatttc aaaaggctgt gtctacttgg aacggatgca tttcattcac 1080
agggatctgg cagctagaaa ttgccttgtt tccgtgaaag actataccag tccacggata 1140
gtgaagattg gagactttgg actcgccaga gacatctata aaaatgatta ctatagaaa 1200
agaggggaag gcctgctccc agttcgggtg atggctccag aaagtttgat ggatggaatc 1260
ttcactactc aatctgatgt atggctcttt ggaattctga tttgggagat tttactctt 1320
ggtcatcagc cttatccagc tcattccaac ctgatgtgt taaactatgt gcaaacagga 1380
gggagactgg agccaccaag aaattgtcct gatgatctgt ggaatttaat gaccagtg 1440
tgggctcaag aaccogacca aagacctact tttcatagaa ttcaggacca acttcagtta 1500
ttcagaaatt ttttcttaa tagcatttat aagtccagag atgaagcaaa caacagtgga 1560
gtcataaatg aaagctttga aggtgaagat ggcgatgtga tttgtttgaa ttcagatgac 1620
attatgccag ttgctttaat gaaacgaag aaccgagaag ggtaaacta tatggtactt 1680
gctacagaat gtggccaagg tgaagaaaag tctgagggtc ctctaggctc ccaggaatct 1740
gaatcttgtg gtctgaggaa agaagagaag gaaccacatg cagacaaaga tttctgccaa 1800
gaaaaacaag tggcttactg cccttctggc aagcctgaag gcctgaacta tgctgtctc 1860
actcacagtg gatatggaga tgggtctgat taa 1893

<210> 4
<211> 630
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Péptido sintético

<400> 4
Met Ser Ala Gly Gly Pro Cys Pro Ala Ala Ala Gly Gly Gly Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ala Ser Cys Ser Val Gly Ala Pro Gly Gly Val Ser Met Phe Arg
20 25 30

Trp Leu Glu Val Leu Glu Lys Glu Phe Asp Lys Ala Phe Val Asp Val
35 40 45

ES 2 637 174 T3

Asp Leu Leu Leu Gly Glu Ile Asp Pro Asp Gln Ala Asp Ile Thr Tyr
 50 55 60

Glu Gly Arg Gln Lys Met Thr Ser Leu Ser Ser Cys Phe Ala Gln Leu
 65 70 75 80

Cys His Lys Ala Gln Ser Val Ser Gln Ile Asn His Lys Leu Glu Ala
 85 90 95

Gln Leu Val Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Glu Thr Gln Ala Glu Lys
 100 105 110

Val Val Leu Glu Lys Glu Val His Asp Gln Leu Leu Gln Leu His Ser
 115 120 125

Ile Gln Leu Gln Leu His Ala Lys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Ser Gly
 130 135 140

Thr Ile Lys Ala Lys Leu Glu Arg Glu Leu Glu Ala Asn Lys Lys Glu
 145 150 155 160

Lys Met Lys Glu Ala Gln Leu Glu Ala Glu Val Lys Leu Leu Arg Lys
 165 170 175

Glu Asn Glu Ala Leu Arg Arg His Ile Ala Val Leu Gln Ala Glu Val
 180 185 190

Tyr Gly Ala Arg Leu Ala Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Glu Leu Ala Gly
 195 200 205

Ser Thr Leu Pro Thr Gln Glu Glu Ile Glu Asn Leu Pro Ala Phe Pro
 210 215 220

Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly
 225 230 235 240

Glu Val Tyr Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly
 245 250 255

Glu Ile Lys Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln
 260 265 270

Glu Lys Ile Glu Phe Leu Lys Glu Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn
 275 280 285

His Pro Asn Ile Leu Lys Gln Leu Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro
 290 295 300

ES 2 637 174 T3

Gln Tyr Ile Ile Leu Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr
 305 310 315 320

Leu Arg Lys Ala Arg Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu
 325 330 335

Val Asp Leu Val Asp Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr
 340 345 350

Leu Glu Arg Met His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys
 355 360 365

Leu Val Ser Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly
 370 375 380

Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys
 385 390 395 400

Arg Gly Glu Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu
 405 410 415

Met Asp Gly Ile Phe Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile
 420 425 430

Leu Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His
 435 440 445

Ser Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu
 450 455 460

Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys
 465 470 475 480

Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp
 485 490 495

Gln Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser
 500 505 510

Arg Asp Glu Ala Asn Asn Ser Gly Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly
 515 520 525

Glu Asp Gly Asp Val Ile Cys Leu Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val
 530 535 540

Ala Leu Met Glu Thr Lys Asn Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu

ES 2 637 174 T3

tgcagtggcg caacggtggc tcaactgcagc gtccaccttt caggctcaag tgatcctccc 1020
 acctcagcct tccaagtagc tgagaccaca ggcatgccac catgcctggt taattgttaa 1080
 ggttttgccct tgttgccctg gctgggttcta gtaactttta accacattta aagtaatcat 1140
 tttgtgaaaa gaaactctaa ttagaagaaa tattttttgtc cttttatctc atctaaaagc 1200
 taacatttaa tagtatctga gttcagtgac tttgcatgca agacatagat tgacattaat 1260
 ctcataaatt tttttttaga tttatttgaa ttaagtatat gactaaagga gttcacatta 1320
 attcctttta aaattttttt tactggtttt tcccttgagg atacctgttc ttttcagagt 1380
 tttcatattt tttttatctc tgagagacat caagaagttc gtgagtatta gttttatcac 1440
 taatttgaga ttcagcaaaa agctacttat gttcactaat tttcctgaat tctcactgta 1500
 gtgaatataa tgaaaaatca atgtactctt ttccaatat gaag 1544

<210> 6
 <211> 3469
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

10

<400> 6
 gtaaaaaatca ctctaaaaat tattattaac atattcatta ttattaaatg tttaaaatgt 60
 gaaggcctca gaatttcttc agtaaaactg ttttgtgagg aaatcaaagg aatgaagagc 120
 tttcccttgt ttattgtttt attgtatact atgctaacag tttatttacc atatatgttc 180
 ttctatattc atcttggact gtttaagaca gtacattacc agttacteta ctgcaagtga 240
 tccttgaaaa ataaaaataa ttttttctag actctgaaac aaagaccaat atactatfff 300
 gagtagatct atcttgtaga ctacattgtc tgtctgtctt gatgcaaatt catctctcac 360
 aatgaatfff aagctaatta tgaataagta tgaagtatac tgtcacctta tgattgctat 420
 tagaatcaac ttatattatc ttggggatgt ttggtttagt tcctttgcta tcatttagac 480
 atattttaag gaaaaactct agcacttctt tttacataga gcagtggccc tcaaattgtg 540
 atctgtggat ctctgagggg ctctgagata ttttagcaga gttcatgagg tcaaagcttt 600
 tcataataat actaagacat cttttgtctt tttttgctat gttgatattt gcactgatgg 660
 tatctgggtg atgcaaaaagc aattggggta aaactgctgg tgccttagca ctaatcaagg 720
 cagtgttgcct aatactagta actgtactag taatcattgt tttcttctt gccatccatt 780
 catagtaaaa gaagaagata ccaatfffct ttaaaaatat ctttgatgaa atggcagtaa 840
 cagttaatff ttaaatattg acctttgagt acctgtcttt ttaatatctt ttgtgatgag 900
 atgggaagta tgcataaagc acttactctg cactactgaac aaagatgctg gtttcaaggg 960

ES 2 637 174 T3

aaagtacata agtgactgaa ctagccattt ttcttcatgg aagacaattt ttacttgaat 1020
 gaatgactaa caaagtatgg attttcggac tatttggaag ccattttcct aaaaatgaac 1080
 aaagtccatc acttcaggaa agacaactga taatatttat tgccagtgat aaaatgtgag 1140
 ctctcaagtg aaagttagaa ctttgtaaaa catacgttga tcaccatgag ettgacagct 1200
 tcctaacact taagcttttc tgatgagatt gatgatgata ttaatgaatg tgattttttg 1260
 atacagtaaa gtgaaatgtg tcaacttttg gaattgctac ataacttcat ggtccaatat 1320
 ttttcaaac accagtaaat gaagttataa aattttgcat gggaaaagat ccattcaaaa 1380
 tgcaagatag gcaaatggat tttaatataa cagagtgtga aaagttcact gataaggttt 1440
 caaattccac attgtcaaat ttttgataa tatcagagaa caatactgac agttatctga 1500
 aaaggctggt aaaactactct tccatttagc aactacatat ctgtgtgagg ctgaactttc 1560
 ttcataact tgtaatagat tgaatggaag cagatatatg aaaatacagc tatcatctac 1620
 aaagccattg aagagatttg taaaattgta aaataatgct actcttctaa ctagaatttt 1680
 tttgtttgga acatagagtt atttgcatt agacaaatgt tatttatatt aaccttctgg 1740
 atttattgtc atttttaaca aagaaatgaa tttttttta gatttttcaa ttttacctac 1800
 taatatggga aacatcagta gctataatcc acataaacag aagcttcttg gagtcctcaa 1860
 tgcttagtat aaaggcctcc tgagaccaa atgttgaact cctggcatgg agttttatgg 1920
 tgaactgata aactgttgca cttttgataa acttgtgtgt tgtaaactgt ctgcacaaag 1980
 atagcagtag cagttactgt tttcactgtg catcttgagc aaaactattg tggcagtatg 2040
 tcaaaacctt aattgttggg ctgctctcca tatggttcca ttgtatttca cacttgctgt 2100
 tttctgtcgg gattagaaag cctgtctctt cctttttttt gtaactgagg ctagaagtct 2160
 tctctgtcac atatgcaaat tgagacact taaaatgtga ctcaactaaa aatttgtgtg 2220
 tataatctt ttaactgact cacttaaaaa aatgtatcta ttggttattg tttcacacgt 2280
 ctatacttta tagatatata tatcacctaa ataggtgata tagtcaacac ttatttattt 2340
 ataagcctat tatttatttt atagatgac agaattcgtt ttaagtttta gctagacatc 2400
 atcttgccaa caaattacat ttaagcaat taactagtat atgcctcagt taactgaagt 2460
 taatgtaata tgaaagcaac aatgaaaaat aaaaatataa ttcacagttc agtagatatt 2520
 tatataagta gaattgactg aattttacaa ttatatgtat tacttctaag tcttacagac 2580
 agcttgatgg tggctcatgc ctgtaattca agcactttgg gaggccaaagg caggaggatc 2640
 gcttgaggcc aggagtacc aacctgggca acatagtga ccctgtctct tcaaaaaaat 2700
 ttttaaaata tagctggaca tgggtgcaca tgettgtagc tccagctact caggaggctg 2760
 aggtggaagg attgetttag cctaggaggt caaggcagca gtgagccgta atcatgccac 2820
 tgcaatccag cctgggcaat agagtgagac cctgtctcag aaaaaaaaaa gaaaaaaaaa 2880

ES 2 637 174 T3

aaaggaaagg aaaacttgat aggaaactta atacaatttt tacataagcc caatatagta 2940
 tttttaaatc tgtacaatat ttgatacctg ccataagagg gaagaattcc cctgttagga 3000
 attactgatt tgattaatat aaggcattat ttttgccctca gattactaat gttaattact 3060
 tgggcattcc tttgtttttc actcaataaa cttatacaac taactttttt ttttttttta 3120
 atttttttaa tcgagacaga gtttcaactct gtcacccagg ctagagtgcg gtggtacgat 3180
 ctcagctcac tgcaacctcc acttcctggc ttcaagtgat tctccttctc cagtctccca 3240
 aatagctggg attacaggca tgtgccacca tgcccggcga atttttgtat ttttaataga 3300
 gacgggggtt caccacattg tccaggctgg tctcgaacct ctaacctcag gttatccacc 3360
 caccttggcc tctcaaagtg ctgggattac aggtatgagc cactgcacct gacccaaaacc 3420
 aactttttaa accagaaagt gtctgctttt tttttctcct ttctttcag 3469

<210> 7
 <211> 3616
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

10

<400> 7
 gtatgttacc atgtctgtct acacactagc ttattaccta aaggttcagt aataaatatc 60
 agtacattct taacattagc aatagataat ggtgactata tatatatata tatatatata 120
 tatatatata taatcttatt atccaaacta ttaaactatt ccattcatgt gatgtgatct 180
 ttctaaaaca tcattatcat catgtcattt ttctcccaa taataatcag ccaccccctt 240
 aattcctacc acatcaattc catgctccta attaggcttc caaggctggt cacaatctgt 300
 tctatccagc catataattc tattcacatt ataccagcct tatgaccact cctacattat 360
 acataacagg cctaagacct ttgtttcttc cccaatatct acctcttcca ctgtgtattt 420
 tattttagtt tatgatatat tgtctttcta atcacatagg caggaaatct cagtgccata 480
 tgtgattttt ccctctactc agtaatcagg tcctgttgat tttaccatct tgatttttct 540
 ctgatgagtt ctcatcttcc tctttccacc ttggctttcc taatttaagg tatcatttct 600
 tgcctgtgcc cttgacttac gcatactgct gacagttaaa tttagttgaa gcacaggctg 660
 gattacttaa tccctctctg aaataccac aatggctctc catttactgc tttcagaatc 720
 agctacaaac ttctttgtgg catgtgaggt cttctgtaat ttatcctcca attgtggttt 780
 atcttttcca atatttatgt ctgtgctgta gccatatcag accagtaaaa agtttttatg 840
 tcacttagtc tttggccctg tgtttgcctc agcctagaat acagggtccc actacctacc 900
 ctgtgcccoct tagctgtgat ttcctattat ttattttctg ccaattgaaa ttcttctcat 960

ES 2 637 174 T3

ccttcaagac ttaaatgaac tcatcataat gcttacctga tgctccttag tcaaatgaat 1020
 tattgcattt tatacaactca catgctatat aaaacttaca tgattcttgt ttatattata 1080
 gtttagttatc tagttagtgtg tgtacagaag tttgctaccc agctcagcaa actttttctg 1140
 aaaagaacca aatagtaaat atgttagact ttgcaggcta catgtgatct ctgtagcatg 1200
 ttcttctttt cttctttttc tgttctcttt ttccttctcc ttctttttta aaataaact 1260
 ttacaaaggt aaaacttatt catagctaata aggggttaca aaatcaggct atagccagat 1320
 ttggtcctca tgccatagtt tgccagactc tggcctacgt gtttgtttcc tctacacaac 1380
 tgaaactacc taagagaaat taccatgttt attcctcagt ttaatatcca tgaaattaaa 1440
 tatgtatgaa gatattatac aaaataataa tgccaactat ttagtatcca aagactgaga 1500
 tttcttggtc ctaaattttat taaaaagata tatatgtttc ctaagtcatt ttaaagtaga 1560
 agattgagtg gatataattcc agtggtttgt tgctctctgc aaaaaaagc aaaaacacct 1620
 tgcttttgat ttcacatggc ataaactctg tctgtatgga tgctttcaag ctaccaacgg 1680
 tctaacaact ggcttgcaaa aatccagtag tagctagctc tgctatatta ctctgtgtgc 1740
 ttaggtagag ctggggcaac ttagctttta tctatgaatt aatttctttt tctgatttat 1800
 attattaggt atgttaacct gtctgtctac aactagctt attacctaaa ggttcagtaa 1860
 taaatatcag tacattctta acattagcaa tagataatgg tgactatata tatatatata 1920
 tatatatata tatatatata atcttattat ccaactatt aaactattcc attcatgtga 1980
 tgtgatcttt ctaaaacatc attatcatca tgtcattttt ctccccaata ataactcagc 2040
 acccccttaa ttctactcac atcaattcca tgctcctaat taggcttcca aggctgttca 2100
 caatctgttc tatccagcca tataattota ttcacattat accagcctta tgaccactcc 2160
 tacattatac ataacaggcc taagacctt gtttcttccc caatatctac ctcttccact 2220
 gtgtatttta ttttagttta tgatatattg ttttctaat cacataggca ggaaatctca 2280
 gtgcatatg tgatttttcc ctctactcag taatcaggtc ctggtgattt taccatcttg 2340
 attttctct gatgagttct catcttctc tttccacctt ggctttccta atttaaggta 2400
 tcatttcttg cctgtgccct tgacttacgc atactgtga cagttaaatt tagttgaagc 2460
 acaggctgga ttacttaatc cctctctgaa ataccacaa tggctctcca tttactgctt 2520
 tcagaatcag ctacaaactt ctttgtggca tgtgaggtct tctgtaattt atcctccaat 2580
 tgtggtttat cttttccaat atttatgtct gtgctgtagc catatcagac cagtaaaaag 2640
 tttttatgct acttagtctt tggcctgtg tttgcctcag cctagaatac aggtccccac 2700
 tacctacct gtgcccctta gctgtgattt cctattattt attttctgcc aattgaaatt 2760
 cttctcatcc ttcaagactt aatgaactc atcataatgc ttacctgatg ctcttagtc 2820
 aatgaatta ttgcatttta tacactcaca tgctatataa aacttacatg attcttgttt 2880

ES 2 637 174 T3

atattatagt tagttatcta gttagttgtg tacagaagtt tgctaccag ctcagcaaac 2940
 tttttctgaa aagaacccaaa tagtaaatat gttagacttt gcaggctaca tgtgatctct 3000
 gtagcatggt cttcttttct tctttttctg ttctcttttt ccttctcctt ctttttaaaa 3060
 ataacacttt acaaaggtaa aacttattca tagctaatag ggggtacaaa atcaggctat 3120
 agccagattt ggtcctcatg ccatagtttg ccagactctg gcctacgtgt ttgtttcctc 3180
 tacacaactg aaactaccta agagaaatta ccatgtttat tcctcagttt aatatccatg 3240
 aaattaaata tgtatgaaga tattatacaa aataataatg ccaactattt agtatccaaa 3300
 gactgagatt tcttggtcct aaatttatta aaaagatata tatgtttcct aagtcatttt 3360
 aaagtagaag attgagtgga tatattccag tggtttggtg ctctctgcaa aaaaaagcaa 3420
 aaacaccttg cttttgattt cacatggcat aaacactgtc tgtatggatg ctttcaagct 3480
 accaacggtc taacaactgg cttgcaaaaa tccagtagta gctagctctg ctatattact 3540
 ctgtgtgctt aggtagagct ggggcaactt agcttttate tatgaattaa tttcttttct 3600
 tgatttatat tattag 3616

<210> 8
 <211> 2937
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

10

<400> 8
 gtaagtataa tagaatTTTT aaaataggca acaaactggt tacttaatca tacctgattg 60
 atttatctct tagttgatct aatctcccac atgaaatatt gcctgattaa gttaataaaa 120
 tttacattgt tacctttggc tatacattta taaccactaa cttctgtgaa ttgttttctg 180
 atctaggcat aactatttta tggaaaatat acatgtacat ttcattgtat actttagata 240
 aaactacttg caagggcacc aacttttagg tttctttaaa acagtattta tttctgattg 300
 gctgcataca aatgttttgt ggcttatggt ttaaaataaa taaaagaaa ataaccctgg 360
 gtacagaaaa aagtatagaa ttaatgggag gccagtgaca atctttgatt gggatagttt 420
 tggtttctaa gcagacaggc tggtttgtaa tgagtagggc ctcttttgca gaagatccat 480
 ttctggcttg tgggatcgac tcttgctttc agacatctga tctgcttatt tcaaatccct 540
 gctcatttat aaatgaccag gaaggcagaa aaattagggt aggtagatag aaagctattt 600
 tttttctaag aagatttact ttaatgataa taaaatgcag taaaacctc aaagggaatg 660
 gtcaagtact gattggactt ttagagttat cacagtgatc atacattctt gtttatttct 720
 gtttcagcac aaataataat agcactttct ttcattcccc aaactgtccg agtttgctta 780

ES 2 637 174 T3

taagatatat ggaccctat ctattgctaa tattgagagt cccaacaca ctgaatcatt 840
 aaaagaagg catgattcct accagaaaag aacactcaaa cacatattaa gaaagttgtg 900
 gcttgttttg ttcacaagta ggggtaagtt acaaggaaa gttgatggaa aagtcacaaa 960
 cataaagttg aactctcagg ataaagacag ccaacacttt actgtgttct aagtctttat 1020
 tctttctgca aagtgattgg agtcacaatc tttatgagag cactttgaag ctcgatttga 1080
 gatttttttc aaagattcca cccagacaat atgtgaaact ccttcagcaa acttggaag 1140
 ctaaaaattt cagctgacct tgccaggatt ttaacctgtg gttccagaga gtctaagtat 1200
 tgcacagctg atgtttgtgc cactaagcca gccctccag acttacgcat atgactgcag 1260
 tataatttggc agttggcata taggcttgac tgcttgtctg ctttcctact ggaaggaga 1320
 attacatgaa gaatccttca gctgaccttt gcttgctttc ttgtacatca ccattgttta 1380
 aaccataac tctagtggat gaacatgaga taatttcaga caacctattg tcttccaag 1440
 acatcctatg gatctctgac tttctcagga cttaaaggtc tttattctgt ttgaaattca 1500
 cgaatttttg agtctagcta agctaattcg gttccttctg tttagcagca gtgcatgtgg 1560
 ttttactagt aagagcgtgt gtgtgcatga gaaaagattg agtaattaa ataacaaaac 1620
 agtcacaatt attttaaaat ttgtattgtg ctgaggcac tcatcagtta taaacataaa 1680
 attagacaat ttttaaaatg agtggtgaca gcctttgctt ctgagcagtc atatctaag 1740
 cataacatta gcctctctgct gggagtaggg gaaaatgtaa acctgtaaaa tacaactgct 1800
 gacctcagga gcttgccatt taatgagga gtttaagacat gcctgtgtgg gaagacaaat 1860
 agcaagatat gtgttaata ataacaaaag acaaaaatag atgaaataag taagacagtg 1920
 cataggataa gcactcacag agaggcgcga ttagtctttc aagttcagat atgaaagatt 1980
 agtagaggtt gctgaggttt cagaaggcat cattgaggat gtgggcttac attgggcctt 2040
 taaaagtga gcgaggtggt gagaacattt caagttgga aaattaattt agcaaaaggt 2100
 acttgtgatc tttcactgtg tagcccttca aattgaattt catgtgaata aaactctaac 2160
 ttcttgaaca tagaagctac tgtgaaatta agttcaaatt ttaatgatca tctctcaaag 2220
 catgcttctg gctttcaact tctgagccaa tagtccagta cagatgacaa tcctattgac 2280
 ataattgtat tttaatatta aaaaaattt attattataa aactaatact gcttattata 2340
 taaggaagac agtacaatt actcatgatt ctacaactag ggcagaccac tgetaacatt 2400
 tggtaaagctt cgttccaata cttttctac atattcgagt atgtgtatat gaacaacaat 2460
 gataaacact cttgtactct gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aattgccatt atactgaaag 2520
 cttttcttt tctactgagg aatataacct ggatgtgact gaactcaaaa atgaatttgt 2580
 ttcactaata attatgtttg ttttggttta tttgactcg tttatgggtg attttgacaa 2640
 ataagtttta atattaagat actttaattt gtttataaca acagtaagaa atacattaaa 2700
 ttttaagaag tgagattaaa aatggtgtag tatgatttgt gtacttatat atggcttttt 2760
 acctggattt aattagtttt ttataagata ttttaaatc aaattatgaa aacttctata 2820
 actattctac tgatagtgtt cttgcataaa aacacttcaa atgcactgtt aacatttctt 2880
 aaaggaaaaa agaagcaata ttttattttg taaattatgt ctttttttcc tttatag 2937

5 <210> 9
<211> 2347

ES 2 637 174 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

5

<400> 9
 Met Lys Asn Ile Tyr Cys Leu Ile Pro Lys Leu Val Asn Phe Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Leu Trp Ile Ser Val Val Gln Cys Thr Val Leu Asn Ser
 20 25 30
 Cys Leu Lys Ser Cys Val Thr Asn Leu Gly Gln Gln Leu Asp Leu Gly
 35 40 45
 Thr Pro His Asn Leu Ser Glu Pro Cys Ile Gln Gly Cys His Phe Trp
 50 55 60
 Asn Ser Val Asp Gln Lys Asn Cys Ala Leu Lys Cys Arg Glu Ser Cys
 65 70 75 80
 Glu Val Gly Cys Ser Ser Ala Glu Gly Ala Tyr Glu Glu Glu Val Leu
 85 90 95
 Glu Asn Ala Asp Leu Pro Thr Ala Pro Phe Ala Ser Ser Ile Gly Ser
 100 105 110
 His Asn Met Thr Leu Arg Trp Lys Ser Ala Asn Phe Ser Gly Val Lys
 115 120 125
 Tyr Ile Ile Gln Trp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Gly Ser Trp Thr Tyr
 130 135 140
 Thr Lys Thr Val Ser Arg Pro Ser Tyr Val Val Lys Pro Leu His Pro
 145 150 155 160
 Phe Thr Glu Tyr Ile Phe Arg Val Val Trp Ile Phe Thr Ala Gln Leu
 165 170 175

ES 2 637 174 T3

Gln Leu Tyr Ser Pro Pro Ser Pro Ser Tyr Arg Thr His Pro His Gly
 180 185 190

Val Pro Glu Thr Ala Pro Leu Ile Arg Asn Ile Glu Ser Ser Ser Pro
 195 200 205

Asp Thr Val Glu Val Ser Trp Asp Pro Pro Gln Phe Pro Gly Gly Pro
 210 215 220

Ile Leu Gly Tyr Asn Leu Arg Leu Ile Ser Lys Asn Gln Lys Leu Asp
 225 230 235 240

Ala Gly Thr Gln Arg Thr Ser Phe Gln Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Asn
 245 250 255

Thr Ile Tyr Arg Phe Ser Ile Ala Ala Val Asn Glu Val Gly Glu Gly
 260 265 270

Pro Glu Ala Glu Ser Ser Ile Thr Thr Ser Ser Ser Ala Val Gln Gln
 275 280 285

Glu Glu Gln Trp Leu Phe Leu Ser Arg Lys Thr Ser Leu Arg Lys Arg
 290 295 300

Ser Leu Lys His Leu Val Asp Glu Ala His Cys Leu Arg Leu Asp Ala
 305 310 315 320

Ile Tyr His Asn Ile Thr Gly Ile Ser Val Asp Val His Gln Gln Ile
 325 330 335

Val Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Leu Ile Trp Ala Lys Lys Ala Ala Asn
 340 345 350

Met Ser Asp Val Ser Asp Leu Arg Ile Phe Tyr Arg Gly Ser Gly Leu
 355 360 365

Ile Ser Ser Ile Ser Ile Asp Trp Leu Tyr Gln Arg Met Tyr Phe Ile
 370 375 380

Met Asp Glu Leu Val Cys Val Cys Asp Leu Glu Asn Cys Ser Asn Ile
 385 390 395 400

Glu Glu Ile Thr Pro Pro Ser Ile Ser Ala Pro Gln Lys Ile Val Ala
 405 410 415

Asp Ser Tyr Asn Gly Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Arg Asp Gly Ile Tyr
 420 425 430

ES 2 637 174 T3

Arg Ala Asp Leu Pro Val Pro Ser Gly Arg Cys Ala Glu Ala Val Arg
 435 440 445

Ile Val Glu Ser Cys Thr Leu Lys Asp Phe Ala Ile Lys Pro Gln Ala
 450 455 460

Lys Arg Ile Ile Tyr Phe Asn Asp Thr Ala Gln Val Phe Met Ser Thr
 465 470 475 480

Phe Leu Asp Gly Ser Ala Ser His Leu Ile Leu Pro Arg Ile Pro Phe
 485 490 495

Ala Asp Val Lys Ser Phe Ala Cys Glu Asn Asn Asp Phe Leu Val Thr
 500 505 510

Asp Gly Lys Val Ile Phe Gln Gln Asp Ala Leu Ser Phe Asn Glu Phe
 515 520 525

Ile Val Gly Cys Asp Leu Ser His Ile Glu Glu Phe Gly Phe Gly Asn
 530 535 540

Leu Val Ile Phe Gly Ser Ser Ser Gln Leu His Pro Leu Pro Gly Arg
 545 550 555 560

Pro Gln Glu Leu Ser Val Leu Phe Gly Ser His Gln Ala Leu Val Gln
 565 570 575

Trp Lys Pro Pro Ala Leu Ala Ile Gly Ala Asn Val Ile Leu Ile Ser
 580 585 590

Asp Ile Ile Glu Leu Phe Glu Leu Gly Pro Ser Ala Trp Gln Asn Trp
 595 600 605

Thr Tyr Glu Val Lys Val Ser Thr Gln Asp Pro Pro Glu Val Thr His
 610 615 620

Ile Phe Leu Asn Ile Ser Gly Thr Met Leu Asn Val Pro Glu Leu Gln
 625 630 635 640

Ser Ala Met Lys Tyr Lys Val Ser Val Arg Ala Ser Ser Pro Lys Arg
 645 650 655

Pro Gly Pro Trp Ser Glu Pro Ser Val Gly Thr Thr Leu Val Pro Ala
 660 665 670

Ser Glu Pro Pro Phe Ile Met Ala Val Lys Glu Asp Gly Leu Trp Ser

ES 2 637 174 T3

675		680		685											
Lys	Pro	Leu	Asn	Ser	Phe	Gly	Pro	Gly	Glu	Phe	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile
690						695					700				
Gly	Asn	Val	Ser	Asp	Met	Asp	Trp	Tyr	Asn	Asn	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Ser
705					710					715					720
Asp	Thr	Lys	Gly	Asp	Val	Phe	Val	Trp	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Asp	Ile
				725					730					735	
Ser	Glu	Asn	Tyr	His	Leu	Pro	Ser	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala
			740					745					750		
Phe	Glu	Trp	Leu	Gly	His	Phe	Leu	Tyr	Trp	Ala	Gly	Lys	Thr	Tyr	Val
		755					760					765			
Ile	Gln	Arg	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gly	His	Thr	Asp	Ile	Val	Thr	His
	770					775					780				
Val	Lys	Leu	Leu	Val	Asn	Asp	Met	Val	Val	Asp	Ser	Val	Gly	Gly	Tyr
785					790					795					800
Leu	Tyr	Trp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Ser	Val	Glu	Ser	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly
				805					810					815	
Glu	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Pro	Trp	Phe	Ser	Gly	Lys	Lys
			820					825					830		
Val	Ile	Ala	Leu	Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Trp	Leu
		835					840					845			
Val	Gln	Asp	Ser	Gln	Cys	Ile	His	Leu	Tyr	Thr	Ala	Val	Leu	Arg	Gly
	850					855					860				
Gln	Ser	Thr	Gly	Asp	Thr	Thr	Ile	Thr	Glu	Phe	Ala	Ala	Trp	Ser	Thr
865					870					875					880
Ser	Glu	Ile	Ser	Gln	Asn	Ala	Leu	Met	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Leu	Phe
				885					890					895	
Trp	Ile	Asn	Gly	Phe	Arg	Ile	Ile	Thr	Thr	Gln	Glu	Ile	Gly	Gln	Lys
			900					905					910		
Thr	Ser	Val	Ser	Val	Leu	Glu	Pro	Ala	Arg	Phe	Asn	Gln	Phe	Thr	Ile
		915					920					925			

ES 2 637 174 T3

Ile Gln Thr Ser Leu Lys Pro Leu Pro Gly Asn Phe Ser Phe Thr Pro
 930 935 940

Lys Val Ile Pro Asp Ser Val Gln Glu Ser Ser Phe Arg Ile Glu Gly
 945 950 955 960

Asn Ala Ser Ser Phe Gln Ile Leu Trp Asn Gly Pro Pro Ala Val Asp
 965 970 975

Trp Gly Val Val Phe Tyr Ser Val Glu Phe Ser Ala His Ser Lys Phe
 980 985 990

Leu Ala Ser Glu Gln His Ser Leu Pro Val Phe Thr Val Glu Gly Leu
 995 1000 1005

Glu Pro Tyr Ala Leu Phe Asn Leu Ser Val Thr Pro Tyr Thr Tyr
 1010 1015 1020

Trp Gly Lys Gly Pro Lys Thr Ser Leu Ser Leu Arg Ala Pro Glu
 1025 1030 1035

Thr Val Pro Ser Ala Pro Glu Asn Pro Arg Ile Phe Ile Leu Pro
 1040 1045 1050

Ser Gly Lys Cys Cys Asn Lys Asn Glu Val Val Val Glu Phe Arg
 1055 1060 1065

Trp Asn Lys Pro Lys His Glu Asn Gly Val Leu Thr Lys Phe Glu
 1070 1075 1080

Ile Phe Tyr Asn Ile Ser Asn Gln Ser Ile Thr Asn Lys Thr Cys
 1085 1090 1095

Glu Asp Trp Ile Ala Val Asn Val Thr Pro Ser Val Met Ser Phe
 1100 1105 1110

Gln Leu Glu Gly Met Ser Pro Arg Cys Phe Ile Ala Phe Gln Val
 1115 1120 1125

Arg Ala Phe Thr Ser Lys Gly Pro Gly Pro Tyr Ala Asp Val Val
 1130 1135 1140

Lys Ser Thr Thr Ser Glu Ile Asn Pro Phe Pro His Leu Ile Thr
 1145 1150 1155

Leu Leu Gly Asn Lys Ile Val Phe Leu Asp Met Asp Gln Asn Gln
 1160 1165 1170

ES 2 637 174 T3

Val Val Trp Thr Phe Ser Ala Glu Arg Val Ile Ser Ala Val Cys
 1175 1180 1185

Tyr Thr Ala Asp Asn Glu Met Gly Tyr Tyr Ala Glu Gly Asp Ser
 1190 1195 1200

Leu Phe Leu Leu His Leu His Asn Arg Ser Ser Ser Glu Leu Phe
 1205 1210 1215

Gln Asp Ser Leu Val Phe Asp Ile Thr Val Ile Thr Ile Asp Trp
 1220 1225 1230

Ile Ser Arg His Leu Tyr Phe Ala Leu Lys Glu Ser Gln Asn Gly
 1235 1240 1245

Met Gln Val Phe Asp Val Asp Leu Glu His Lys Val Lys Tyr Pro
 1250 1255 1260

Arg Glu Val Lys Ile His Asn Arg Asn Ser Thr Ile Ile Ser Phe
 1265 1270 1275

Ser Val Tyr Pro Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Trp Thr Glu Val Ser
 1280 1285 1290

Asn Phe Gly Tyr Gln Met Phe Tyr Tyr Ser Ile Ile Ser His Thr
 1295 1300 1305

Leu His Arg Ile Leu Gln Pro Thr Ala Thr Asn Gln Gln Asn Lys
 1310 1315 1320

Arg Asn Gln Cys Ser Cys Asn Val Thr Glu Phe Glu Leu Ser Gly
 1325 1330 1335

Ala Met Ala Ile Asp Thr Ser Asn Leu Glu Lys Pro Leu Ile Tyr
 1340 1345 1350

Phe Ala Lys Ala Gln Glu Ile Trp Ala Met Asp Leu Glu Gly Cys
 1355 1360 1365

Gln Cys Trp Arg Val Ile Thr Val Pro Ala Met Leu Ala Gly Lys
 1370 1375 1380

Thr Leu Val Ser Leu Thr Val Asp Gly Asp Leu Ile Tyr Trp Ile
 1385 1390 1395

Ile Thr Ala Lys Asp Ser Thr Gln Ile Tyr Gln Ala Lys Lys Gly
 1400 1405 1410

ES 2 637 174 T3

Asn Gly Ala Ile Val Ser Gln Val Lys Ala Leu Arg Ser Arg His
 1415 1420 1425

Ile Leu Ala Tyr Ser Ser Val Met Gln Pro Phe Pro Asp Lys Ala
 1430 1435 1440

Phe Leu Ser Leu Ala Ser Asp Thr Val Glu Pro Thr Ile Leu Asn
 1445 1450 1455

Ala Thr Asn Thr Ser Leu Thr Ile Arg Leu Pro Leu Ala Lys Thr
 1460 1465 1470

Asn Leu Thr Trp Tyr Gly Ile Thr Ser Pro Thr Pro Thr Tyr Leu
 1475 1480 1485

Val Tyr Tyr Ala Glu Val Asn Asp Arg Lys Asn Ser Ser Asp Leu
 1490 1495 1500

Lys Tyr Arg Ile Leu Glu Phe Gln Asp Ser Ile Ala Leu Ile Glu
 1505 1510 1515

Asp Leu Gln Pro Phe Ser Thr Tyr Met Ile Gln Ile Ala Val Lys
 1520 1525 1530

Asn Tyr Tyr Ser Asp Pro Leu Glu His Leu Pro Pro Gly Lys Glu
 1535 1540 1545

Ile Trp Gly Lys Thr Lys Asn Gly Val Pro Glu Ala Val Gln Leu
 1550 1555 1560

Ile Asn Thr Thr Val Arg Ser Asp Thr Ser Leu Ile Ile Ser Trp
 1565 1570 1575

Arg Glu Ser His Lys Pro Asn Gly Pro Lys Glu Ser Val Arg Tyr
 1580 1585 1590

Gln Leu Ala Ile Ser His Leu Ala Leu Ile Pro Glu Thr Pro Leu
 1595 1600 1605

Arg Gln Ser Glu Phe Pro Asn Gly Arg Leu Thr Leu Leu Val Thr
 1610 1615 1620

Arg Leu Ser Gly Gly Asn Ile Tyr Val Leu Lys Val Leu Ala Cys
 1625 1630 1635

His Ser Glu Glu Met Trp Cys Thr Glu Ser His Pro Val Thr Val

ES 2 637 174 T3

1640		1645		1650
Glu Met 1655	Phe Asn Thr Pro	Glu 1660	Lys Pro Tyr Ser	Leu Val Pro Glu 1665
Asn Thr 1670	Ser Leu Gln Phe	Asn 1675	Trp Lys Ala Pro	Leu Asn Val Asn 1680
Leu Ile 1685	Arg Phe Trp Val	Glu 1690	Leu Gln Lys Trp	Lys Tyr Asn Glu 1695
Phe Tyr 1700	His Val Lys Thr	Ser 1705	Cys Ser Gln Gly	Pro Ala Tyr Val 1710
Cys Asn 1715	Ile Thr Asn Leu	Gln 1720	Pro Tyr Thr Ser	Tyr Asn Val Arg 1725
Val Val 1730	Val Val Tyr Lys	Thr 1735	Gly Glu Asn Ser	Thr Ser Leu Pro 1740
Glu Ser 1745	Phe Lys Thr Lys	Ala 1750	Gly Val Pro Asn	Lys Pro Gly Ile 1755
Pro Lys 1760	Leu Leu Glu Gly	Ser 1765	Lys Asn Ser Ile	Gln Trp Glu Lys 1770
Ala Glu 1775	Asp Asn Gly Cys	Arg 1780	Ile Thr Tyr Tyr	Ile Leu Glu Ile 1785
Arg Lys 1790	Ser Thr Ser Asn	Asn 1795	Leu Gln Asn Gln	Asn Leu Arg Trp 1800
Lys Met 1805	Thr Phe Asn Gly	Ser 1810	Cys Ser Ser Val	Cys Thr Trp Lys 1815
Ser Lys 1820	Asn Leu Lys Gly	Ile 1825	Phe Gln Phe Arg	Val Val Ala Ala 1830
Asn Asn 1835	Leu Gly Phe Gly	Glu 1840	Tyr Ser Gly Ile	Ser Glu Asn Ile 1845
Ile Leu 1850	Val Gly Asp Asp	Phe 1855	Trp Ile Pro Glu	Thr Ser Phe Ile 1860
Leu Thr 1865	Ile Ile Val Gly	Ile 1870	Phe Leu Val Val	Thr Ile Pro Leu 1875

ES 2 637 174 T3

Thr Phe Val Trp His Arg Arg Leu Lys Asn Gln Lys Ser Ala Lys
 1880 1885 1890

Glu Gly Val Thr Val Leu Ile Asn Glu Asp Lys Glu Leu Ala Glu
 1895 1900 1905

Leu Arg Gly Leu Ala Ala Gly Val Gly Leu Ala Asn Ala Cys Tyr
 1910 1915 1920

Ala Ile His Thr Leu Pro Thr Gln Glu Glu Ile Glu Asn Leu Pro
 1925 1930 1935

Ala Phe Pro Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser
 1940 1945 1950

Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu
 1955 1960 1965

Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val Ala Val Lys Thr Leu Lys
 1970 1975 1980

Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe Leu Lys Glu Ala
 1985 1990 1995

His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile Leu Lys Gln Leu
 2000 2005 2010

Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu Glu Leu
 2015 2020 2025

Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg Met
 2030 2035 2040

Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val Asp
 2045 2050 2055

Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met
 2060 2065 2070

His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser
 2075 2080 2085

Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe
 2090 2095 2100

Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg
 2105 2110 2115

ES 2 637 174 T3

Gly Glu Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu
 2120 2125 2130

Met Asp Gly Ile Phe Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 2135 2140 2145

Ile Leu Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro
 2150 2155 2160

Ala His Ser Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly
 2165 2170 2175

Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu
 2180 2185 2190

Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe
 2195 2200 2205

His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe Leu
 2210 2215 2220

Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn Asn Ser Gly Val
 2225 2230 2235

Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val Ile Cys Leu
 2240 2245 2250

Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr Lys Asn
 2255 2260 2265

Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly Gln
 2270 2275 2280

Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu
 2285 2290 2295

Ser Cys Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys
 2300 2305 2310

Asp Phe Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys
 2315 2320 2325

Pro Glu Gly Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly
 2330 2335 2340

Asp Gly Ser Asp
 2345

<210> 10
 <211> 1881
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

10 <400> 10

ES 2 637 174 T3

Met Lys Asn Ile Tyr Cys Leu Ile Pro Lys Leu Val Asn Phe Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Gly Cys Leu Trp Ile Ser Val Val Gln Cys Thr Val Leu Asn Ser
 20 25 30

Cys Leu Lys Ser Cys Val Thr Asn Leu Gly Gln Gln Leu Asp Leu Gly
 35 40 45

Thr Pro His Asn Leu Ser Glu Pro Cys Ile Gln Gly Cys His Phe Trp
 50 55 60

Asn Ser Val Asp Gln Lys Asn Cys Ala Leu Lys Cys Arg Glu Ser Cys
 65 70 75 80

Glu Val Gly Cys Ser Ser Ala Glu Gly Ala Tyr Glu Glu Glu Val Leu
 85 90 95

Glu Asn Ala Asp Leu Pro Thr Ala Pro Phe Ala Ser Ser Ile Gly Ser
 100 105 110

His Asn Met Thr Leu Arg Trp Lys Ser Ala Asn Phe Ser Gly Val Lys
 115 120 125

Tyr Ile Ile Gln Trp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Gly Ser Trp Thr Tyr
 130 135 140

Thr Lys Thr Val Ser Arg Pro Ser Tyr Val Val Lys Pro Leu His Pro
 145 150 155 160

Phe Thr Glu Tyr Ile Phe Arg Val Val Trp Ile Phe Thr Ala Gln Leu
 165 170 175

Gln Leu Tyr Ser Pro Pro Ser Pro Ser Tyr Arg Thr His Pro His Gly
 180 185 190

Val Pro Glu Thr Ala Pro Leu Ile Arg Asn Ile Glu Ser Ser Ser Pro
 195 200 205

ES 2 637 174 T3

Asp Thr Val Glu Val Ser Trp Asp Pro Pro Gln Phe Pro Gly Gly Pro
 210 215 220

Ile Leu Gly Tyr Asn Leu Arg Leu Ile Ser Lys Asn Gln Lys Leu Asp
 225 230 235 240

Ala Gly Thr Gln Arg Thr Ser Phe Gln Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Asn
 245 250 255

Thr Ile Tyr Arg Phe Ser Ile Ala Ala Val Asn Glu Val Gly Glu Gly
 260 265 270

Pro Glu Ala Glu Ser Ser Ile Thr Thr Ser Ser Ser Ala Val Gln Gln
 275 280 285

Glu Glu Gln Trp Leu Phe Leu Ser Arg Lys Thr Ser Leu Arg Lys Arg
 290 295 300

Ser Leu Lys His Leu Val Asp Glu Ala His Cys Leu Arg Leu Asp Ala
 305 310 315 320

Ile Tyr His Asn Ile Thr Gly Ile Ser Val Asp Val His Gln Gln Ile
 325 330 335

Val Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Leu Ile Trp Ala Lys Lys Ala Ala Asn
 340 345 350

Met Ser Asp Val Ser Asp Leu Arg Ile Phe Tyr Arg Gly Ser Gly Leu
 355 360 365

Ile Ser Ser Ile Ser Ile Asp Trp Leu Tyr Gln Arg Met Tyr Phe Ile
 370 375 380

Met Asp Glu Leu Val Cys Val Cys Asp Leu Glu Asn Cys Ser Asn Ile
 385 390 395 400

Glu Glu Ile Thr Pro Pro Ser Ile Ser Ala Pro Gln Lys Ile Val Ala
 405 410 415

Asp Ser Tyr Asn Gly Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Arg Asp Gly Ile Tyr
 420 425 430

Arg Ala Asp Leu Pro Val Pro Ser Gly Arg Cys Ala Glu Ala Val Arg
 435 440 445

Ile Val Glu Ser Cys Thr Leu Lys Asp Phe Ala Ile Lys Pro Gln Ala
 450 455 460

ES 2 637 174 T3

Lys Arg Ile Ile Tyr Phe Asn Asp Thr Ala Gln Val Phe Met Ser Thr
 465 470 475 480
 Phe Leu Asp Gly Ser Ala Ser His Leu Ile Leu Pro Arg Ile Pro Phe
 485 490 495
 Ala Asp Val Lys Ser Phe Ala Cys Glu Asn Asn Asp Phe Leu Val Thr
 500 505 510
 Asp Gly Lys Val Ile Phe Gln Gln Asp Ala Leu Ser Phe Asn Glu Phe
 515 520 525
 Ile Val Gly Cys Asp Leu Ser His Ile Glu Glu Phe Gly Phe Gly Asn
 530 535 540
 Leu Val Ile Phe Gly Ser Ser Ser Gln Leu His Pro Leu Pro Gly Arg
 545 550 555 560
 Pro Gln Glu Leu Ser Val Leu Phe Gly Ser His Gln Ala Leu Val Gln
 565 570 575
 Trp Lys Pro Pro Ala Leu Ala Ile Gly Ala Asn Val Ile Leu Ile Ser
 580 585 590
 Asp Ile Ile Glu Leu Phe Glu Leu Gly Pro Ser Ala Trp Gln Asn Trp
 595 600 605
 Thr Tyr Glu Val Lys Val Ser Thr Gln Asp Pro Pro Glu Val Thr His
 610 615 620
 Ile Phe Leu Asn Ile Ser Gly Thr Met Leu Asn Val Pro Glu Leu Gln
 625 630 635 640
 Ser Ala Met Lys Tyr Lys Val Ser Val Arg Ala Ser Ser Pro Lys Arg
 645 650 655
 Pro Gly Pro Trp Ser Glu Pro Ser Val Gly Thr Thr Leu Val Pro Ala
 660 665 670
 Ser Glu Pro Pro Phe Ile Met Ala Val Lys Glu Asp Gly Leu Trp Ser
 675 680 685
 Lys Pro Leu Asn Ser Phe Gly Pro Gly Glu Phe Leu Ser Ser Asp Ile
 690 695 700
 Gly Asn Val Ser Asp Met Asp Trp Tyr Asn Asn Ser Leu Tyr Tyr Ser

ES 2 637 174 T3

```

705             710             715             720

Asp Thr Lys Gly Asp Val Phe Val Trp Leu Leu Asn Gly Thr Asp Ile
      725                               730                   735

Ser Glu Asn Tyr His Leu Pro Ser Ile Ala Gly Ala Gly Ala Leu Ala
      740                               745                   750

Phe Glu Trp Leu Gly His Phe Leu Tyr Trp Ala Gly Lys Thr Tyr Val
      755                               760                   765

Ile Gln Arg Gln Ser Val Leu Thr Gly His Thr Asp Ile Val Thr His
      770                               775                   780

Val Lys Leu Leu Val Asn Asp Met Val Val Asp Ser Val Gly Gly Tyr
      785                               790                   795                   800

Leu Tyr Trp Thr Thr Leu Tyr Ser Val Glu Ser Thr Arg Leu Asn Gly
      805                               810                   815

Glu Ser Ser Leu Val Leu Gln Thr Gln Pro Trp Phe Ser Gly Lys Lys
      820                               825                   830

Val Ile Ala Leu Thr Leu Asp Leu Ser Asp Gly Leu Leu Tyr Trp Leu
      835                               840                   845

Val Gln Asp Ser Gln Cys Ile His Leu Tyr Thr Ala Val Leu Arg Gly
      850                               855                   860

Gln Ser Thr Gly Asp Thr Thr Ile Thr Glu Phe Ala Ala Trp Ser Thr
      865                               870                   875                   880

Ser Glu Ile Ser Gln Asn Ala Leu Met Tyr Tyr Ser Gly Arg Leu Phe
      885                               890                   895

Trp Ile Asn Gly Phe Arg Ile Ile Thr Thr Gln Glu Ile Gly Gln Lys
      900                               905                   910

Thr Ser Val Ser Val Leu Glu Pro Ala Arg Phe Asn Gln Phe Thr Ile
      915                               920                   925

Ile Gln Thr Ser Leu Lys Pro Leu Pro Gly Asn Phe Ser Phe Thr Pro
      930                               935                   940

Lys Val Ile Pro Asp Ser Val Gln Glu Ser Ser Phe Arg Ile Glu Gly
      945                               950                   955                   960

```

ES 2 637 174 T3

Asn Ala Ser Ser Phe Gln Ile Leu Trp Asn Gly Pro Pro Ala Val Asp
 965 970 975
 Trp Gly Val Val Phe Tyr Ser Val Glu Phe Ser Ala His Ser Lys Phe
 980 985 990
 Leu Ala Ser Glu Gln His Ser Leu Pro Val Phe Thr Val Glu Gly Leu
 995 1000 1005
 Glu Pro Tyr Ala Leu Phe Asn Leu Ser Val Thr Pro Tyr Thr Tyr
 1010 1015 1020
 Trp Gly Lys Gly Pro Lys Thr Ser Leu Ser Leu Arg Ala Pro Glu
 1025 1030 1035
 Thr Val Pro Ser Ala Pro Glu Asn Pro Arg Ile Phe Ile Leu Pro
 1040 1045 1050
 Ser Gly Lys Cys Cys Asn Lys Asn Glu Val Val Val Glu Phe Arg
 1055 1060 1065
 Trp Asn Lys Pro Lys His Glu Asn Gly Val Leu Thr Lys Phe Glu
 1070 1075 1080
 Ile Phe Tyr Asn Ile Ser Asn Gln Ser Ile Thr Asn Lys Thr Cys
 1085 1090 1095
 Glu Asp Trp Ile Ala Val Asn Val Thr Pro Ser Val Met Ser Phe
 1100 1105 1110
 Gln Leu Glu Gly Met Ser Pro Arg Cys Phe Ile Ala Phe Gln Val
 1115 1120 1125
 Arg Ala Phe Thr Ser Lys Gly Pro Gly Pro Tyr Ala Asp Val Val
 1130 1135 1140
 Lys Ser Thr Thr Ser Glu Ile Asn Pro Phe Pro His Leu Ile Thr
 1145 1150 1155
 Leu Leu Gly Asn Lys Ile Val Phe Leu Asp Met Asp Gln Asn Gln
 1160 1165 1170
 Val Val Trp Thr Phe Ser Ala Glu Arg Val Ile Ser Ala Val Cys
 1175 1180 1185
 Tyr Thr Ala Asp Asn Glu Met Gly Tyr Tyr Ala Glu Gly Asp Ser
 1190 1195 1200

ES 2 637 174 T3

Leu Phe Leu Leu His Leu His Asn Arg Ser Ser Ser Glu Leu Phe
 1205 1210 1215

Gln Asp Ser Leu Val Phe Asp Ile Thr Val Ile Thr Ile Asp Trp
 1220 1225 1230

Ile Ser Arg His Leu Tyr Phe Ala Leu Lys Glu Ser Gln Asn Gly
 1235 1240 1245

Met Gln Val Phe Asp Val Asp Leu Glu His Lys Val Lys Tyr Pro
 1250 1255 1260

Arg Glu Val Lys Ile His Asn Arg Asn Ser Thr Ile Ile Ser Phe
 1265 1270 1275

Ser Val Tyr Pro Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Trp Thr Glu Val Ser
 1280 1285 1290

Asn Phe Gly Tyr Gln Met Phe Tyr Tyr Ser Ile Ile Ser His Thr
 1295 1300 1305

Leu His Arg Ile Leu Gln Pro Thr Ala Thr Asn Gln Gln Asn Lys
 1310 1315 1320

Arg Asn Gln Cys Ser Cys Asn Val Thr Glu Phe Glu Leu Ser Gly
 1325 1330 1335

Ala Met Ala Ile Asp Thr Ser Asn Leu Glu Lys Pro Leu Ile Tyr
 1340 1345 1350

Phe Ala Lys Ala Gln Glu Ile Trp Ala Met Asp Leu Glu Gly Cys
 1355 1360 1365

Gln Cys Trp Arg Val Ile Thr Val Pro Ala Met Leu Ala Gly Lys
 1370 1375 1380

Thr Leu Val Ser Leu Thr Val Asp Gly Asp Leu Ile Tyr Trp Ile
 1385 1390 1395

Ile Thr Ala Lys Asp Ser Thr Gln Ile Tyr Gln Ala Lys Lys Gly
 1400 1405 1410

Asn Gly Ala Ile Val Ser Gln Val Lys Ala Leu Arg Ser Arg His
 1415 1420 1425

Ile Leu Ala Tyr Ser Ser Val Met Gln Pro Phe Pro Asp Lys Ala
 1430 1435 1440

ES 2 637 174 T3

Phe Leu Ser Leu Ala Ser Asp Thr Val Glu Pro Thr Ile Leu Asn
1445 1450 1455

Ala Thr Asn Thr Ser Leu Thr Ile Arg Leu Pro Leu Ala Lys Thr
1460 1465 1470

Asn Leu Thr Trp Tyr Gly Ile Thr Ser Pro Thr Pro Thr Tyr Leu
1475 1480 1485

Val Tyr Tyr Ala Glu Val Asn Asp Arg Lys Asn Ser Ser Asp Leu
1490 1495 1500

Lys Tyr Arg Ile Leu Glu Phe Gln Asp Ser Ile Ala Leu Ile Glu
1505 1510 1515

Asp Leu Gln Pro Phe Ser Thr Tyr Met Ile Gln Ile Ala Val Lys
1520 1525 1530

Asn Tyr Tyr Ser Asp Pro Leu Glu His Leu Pro Pro Gly Lys Glu
1535 1540 1545

Ile Trp Gly Lys Thr Lys Asn Gly Val Pro Glu Ala Val Gln Leu
1550 1555 1560

Ile Asn Thr Thr Val Arg Ser Asp Thr Ser Leu Ile Ile Ser Trp
1565 1570 1575

Arg Glu Ser His Lys Pro Asn Gly Pro Lys Glu Ser Val Arg Tyr
1580 1585 1590

Gln Leu Ala Ile Ser His Leu Ala Leu Ile Pro Glu Thr Pro Leu
1595 1600 1605

Arg Gln Ser Glu Phe Pro Asn Gly Arg Leu Thr Leu Leu Val Thr
1610 1615 1620

Arg Leu Ser Gly Gly Asn Ile Tyr Val Leu Lys Val Leu Ala Cys
1625 1630 1635

His Ser Glu Glu Met Trp Cys Thr Glu Ser His Pro Val Thr Val
1640 1645 1650

Glu Met Phe Asn Thr Pro Glu Lys Pro Tyr Ser Leu Val Pro Glu
1655 1660 1665

Asn Thr Ser Leu Gln Phe Asn Trp Lys Ala Pro Leu Asn Val Asn

ES 2 637 174 T3

1670 1675 1680

Leu Ile Arg Phe Trp Val Glu Leu Gln Lys Trp Lys Tyr Asn Glu
1685 1690 1695

Phe Tyr His Val Lys Thr Ser Cys Ser Gln Gly Pro Ala Tyr Val
1700 1705 1710

Cys Asn Ile Thr Asn Leu Gln Pro Tyr Thr Ser Tyr Asn Val Arg
1715 1720 1725

Val Val Val Val Tyr Lys Thr Gly Glu Asn Ser Thr Ser Leu Pro
1730 1735 1740

Glu Ser Phe Lys Thr Lys Ala Gly Val Pro Asn Lys Pro Gly Ile
1745 1750 1755

Pro Lys Leu Leu Glu Gly Ser Lys Asn Ser Ile Gln Trp Glu Lys
1760 1765 1770

Ala Glu Asp Asn Gly Cys Arg Ile Thr Tyr Tyr Ile Leu Glu Ile
1775 1780 1785

Arg Lys Ser Thr Ser Asn Asn Leu Gln Asn Gln Asn Leu Arg Trp
1790 1795 1800

Lys Met Thr Phe Asn Gly Ser Cys Ser Ser Val Cys Thr Trp Lys
1805 1810 1815

Ser Lys Asn Leu Lys Gly Ile Phe Gln Phe Arg Val Val Ala Ala
1820 1825 1830

Asn Asn Leu Gly Phe Gly Glu Tyr Ser Gly Ile Ser Glu Asn Ile
1835 1840 1845

Ile Leu Val Gly Asp Asp Phe Trp Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile
1850 1855 1860

Leu Thr Ile Ile Val Gly Ile Phe Leu Val Val Thr Ile Pro Leu
1865 1870 1875

Thr Phe Val
1880

<210> 11
<211> 28
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 11

ES 2 637 174 T3

Asp Phe Trp Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile Leu Thr Ile Ile Val Gly
 1 5 10 15

Ile Phe Leu Val Val Thr Ile Pro Leu Thr Phe Val
 20 25

<210> 12

<211> 466

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10

<400> 12

Trp His Arg Arg Leu Lys Asn Gln Lys Ser Ala Lys Glu Gly Val Thr
 1 5 10 15

Val Leu Ile Asn Glu Asp Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Gly Leu Ala
 20 25 30

Ala Gly Val Gly Leu Ala Asn Ala Cys Tyr Ala Ile His Thr Leu Pro
 35 40 45

Thr Gln Glu Glu Ile Glu Asn Leu Pro Ala Phe Pro Arg Glu Lys Leu
 50 55 60

Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu
 65 70 75 80

Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val
 85 90 95

Ala Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu
 100 105 110

Phe Leu Lys Glu Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile
 115 120 125

Leu Lys Gln Leu Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile
 130 135 140

Leu Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala
 145 150 155 160

ES 2 637 174 T3

Arg Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val
 165 170 175

Asp Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met
 180 185 190

His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Val
 195 200 205

Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu
 210 215 220

Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly
 225 230 235 240

Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile
 245 250 255

Phe Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu
 260 265 270

Ile Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp
 275 280 285

Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn
 290 295 300

Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu
 305 310 315 320

Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asn Gln Leu Gln Leu
 325 330 335

Phe Arg Asn Phe Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Gln Cys Arg Asp Glu Ala
 340 345 350

Asn Asn Ser Gly Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp
 355 360 365

Val Ile Cys Leu Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Val Leu Met Glu
 370 375 380

Thr Lys Asn Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys
 385 390 395 400

Gly Gln Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser
 405 410 415

ES 2 637 174 T3

Glu Ser Cys Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys
 420 425 430

Asp Phe Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro
 435 440 445

Glu Gly Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly
 450 455 460

Ser Asp
 465

<210> 13

<211> 421

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 13

Thr Leu Pro Thr Gln Glu Glu Ile Glu Asn Leu Pro Ala Phe Pro Arg
 1 5 10 15

Glu Lys Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu
 20 25 30

Val Tyr Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu
 35 40 45

Ile Lys Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu
 50 55 60

Lys Ile Glu Phe Leu Lys Glu Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn His
 65 70 75 80

Pro Asn Ile Leu Lys Gln Leu Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln
 85 90 95

Tyr Ile Ile Leu Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu
 100 105 110

Arg Lys Ala Arg Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val
 115 120 125

Asp Leu Val Asp Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu
 130 135 140

ES 2 637 174 T3

Glu Arg Met His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu
 145 150 155 160
 Val Ser Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp
 165 170 175
 Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg
 180 185 190
 Gly Glu Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met
 195 200 205
 Asp Gly Ile Phe Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu
 210 215 220
 Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser
 225 230 235 240
 Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro
 245 250 255
 Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp
 260 265 270
 Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln
 275 280 285
 Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg
 290 295 300
 Asp Glu Ala Asn Asn Ser Gly Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Asp Val Ile Cys Leu Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala
 325 330 335
 Leu Met Glu Thr Lys Asn Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala
 340 345 350
 Thr Glu Cys Gly Gln Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser
 355 360 365
 Gln Glu Ser Glu Ser Cys Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His
 370 375 380
 Ala Asp Lys Asp Phe Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser
 385 390 395 400
 Gly Lys Pro Glu Gly Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr
 405 410 415
 Gly Asp Gly Ser Asp
 420

5 <210> 14
 <211> 7725
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Nucleótido Sintético

5

<400> 14

gtgagtacta acataactcaa tactcagaaa actctgtggtt tcagtttttt tcttatcact	60
tatttcaacta atcctagaga tatatgaaat tgttctttaa aagcagtaca ttattatttc	120
tagaacttga atgaagaaat tcagaaaata taggagacct tgcaggcagt aatgaaataa	180
tactggctgg gtctggctgg atcctgaact gggcaaaatt acttcttctt tcagtatcct	240
tatttcatgt ctagctatga caattttatg gtgataacta tatgaaaata gtgttactga	300
atgttcaaaa aatattttatt ggctactata tttgagatac taggatgaaa aatataagaa	360
gttcattaaa aattaactag tgttctgaaa gatatacctt aactctgaga tgagctctat	420
aagaatggaa ggaacaaaga tctagaacca aaaataccat ttgacctaga aattacatta	480
ctagttacat acccaaagga atataaatca ttctattaca aagatacatg cacacgtatg	540
ttcactgtag cactattcac aataatgaat catttggat caacccaaat gcccgtaac	600
attagactgg ttgaagcaaa tgtggtacat atacaccatg gcatactatg cagccataaa	660
aaggaatgag ataatgtttt tttgcaggga tatggatgaa gctggaagct attaacctca	720
gcaaactaat tcaggaacag aaaaccaaac actgcgtggt ctcacttaca agtgggagct	780
gaacaatgag aacgcatgga cacaaggagg ggaacaacac aactggggc ctgtcagggg	840
gaggggtggg gggatagaga gtattaggaa aaatagctaa tgcattgctgg gcttaatacc	900
taggtgatgg tttgctaggt gtagtaaacc accatgggac atgtttaccc atgtaacaaa	960
ccttcacgtc ctgcacatgt accccagaac taaaaataaa aaaatttgaa aaaaagaatg	1020
gagggaaaaat gctccaaaac ttatgatagt tttctttatt ttcatttatc acttattttg	1080
tttcaagttg agatatattg ttaatcttat caccaattca tcaaatccat cactaataaa	1140
aacttcaaat gctcatttaa aaatatgtaa tcatataaga atatttctga atatttcttt	1200
ttttaaaatt tcttcttaaa aaataagata catgtgcaga acgtgcaggg ttgttacata	1260
ggatatacatg tgccatggtg gtttgctgca cctattgacc tgtcctctaa gttccctccc	1320

ES 2 637 174 T3

ctcagctcct atccctcaac aggccttggg gtgtgctggt cccctctctg tatccatgtg 1380
 ttctcaatgt tcaactocca cttatgagtg agaacacgty ctgttttggt ctctgttctt 1440
 gtgttagggt gctgaggatg atgacttcca gcttcatcca tgtccctgca aaggacatga 1500
 tetcatctct tcttatggct gcatagtatt ccatgggtga tatgtaccac attttcttta 1560
 tctggtttgt cattgatgga ttggcttggg tccatgtctt tgttattgta aacagtgctg 1620
 cagtaaacat acatgtgcat gtgtctttat agtagagtga tttatactcc ttggggtatg 1680
 tactcaataa tgagattact ggggtcaaat ttatttctgg ttctagatcc ttgaggaatt 1740
 gccatactgt ettccacaat ggttgaata atttacttta ccaccaacag tgtaaaagta 1800
 ttctattttc tccacaccct catcagctc tattgtttcc tgacttttta atagttgcca 1860
 ttctgactcg cgtgagatgg tatctcattg tagttttgat ttgtactcct ctgatgatca 1920
 gtgatgttga gcttttttca tacgtttatt ggctgcataa atcccttttt gagaagtgtc 1980
 tgttcatatc ttttgccac tttttgatgg ggttgtctgt ctttttcttg taaatatgtt 2040
 taagttcctt gtacattctg gatattagcc ctttgtcaga tggatagatt gcaaaatfff 2100
 tctcccattc tgtaggttgt ctgttcactc tgatgatagt ttcttttgct gtacagaagc 2160
 tctttagttt agtttagatcc cttttgtcta ttttggcttt tgttgccatt gcttttggtg 2220
 ttttagtcat gaagtctttg cccatgccta tgtcctgaat ggtattgcct aggttttctt 2280
 ctagggtttt tatggttttg gtttttacat ttaagtgttt aatccatctt gagttaaatt 2340
 ttgtataagg ttaaggaatg ggcccagttt cagttttctg catatggcta gccagttttc 2400
 ccagcaccat ttactaaata ggagatcctt tctcattgct ttgtttttgt taggtttgtc 2460
 aaagatcaaa tggttgtaga tgtgtgggtg aatttctgag gtctctgttc tgetccattg 2520
 gtctatataa ttgttttggg accagtacca tgcctgtgta ctgtagcttt gtaatatagt 2580
 ttgaagtcag gtagcatgat gcctccaagt ttgttctttt tgcttaggat tgtcttggct 2640
 acatggggtc ttctttgatt ctatgtgaaa tttaaaataa ctttttctaa ttctatgaag 2700
 aatgtcaacg gtagttagat gagaatagca ttgaatctat aaattactct gggcagaatg 2760
 gccattttca tgatactcat tattcctgtc catgggatg gaatgttttt ccatttattt 2820
 gtgtcctttc ttatttctct gagcaatggg ttgtagtttt ccttgaagag gtccttcaca 2880
 tccttggtta gctgtattcg taggtatfff attctctttg tagctattgt gaatgggagt 2940
 tcattcatga tttggctctc tgcttgcta ttgttgggtg aaaggaatgc ttgtgatttt 3000
 tgcaattga ttttttatct tgagactttg ctgaagtggc ttatcagttc aagaagtttt 3060
 tgggctgaga tgatgggggt ttctaataac aaaatcatgt catctgcaa cagagacaac 3120
 ttgacttctt ctcttctat ttgaataccc tttatttctt cctcttgcct gattgcctg 3180
 accagaactt ccaatactat gttgaatagg agtggtgaga gtggacacc ttgtcttcta 3240

ES 2 637 174 T3

ctggttttca aaggaattc ttccaggttt tgctcattca atatgatatt ggctgtaggt 3300
 ttgtcataaa tagttcttat tatttagaga tatgttccat aaaaacctag tttattgaga 3360
 gtttttaaca taaagggatg ttgatgttga attttatcaa aggccctttc tgcatctatt 3420
 cagataatcg tgtgattttt gtctttgggt ctgtttatgt gatggattac atttattgat 3480
 ttgcatatgt tgaatcagcc ttgcatccca gggatgaagc cgacttgttc gtgggtggata 3540
 tgttttttga tgtgctgctg gattcagttt gccagtattt tattgaggat ttttacatca 3600
 atgttcatca ggtatattgg cccaaagttt gttgttgtgt ctcttcccag ttttggatc 3660
 aggatgatgc tggcttcata aatgagttt ggaaggaatt cctccttttc cattgtttgg 3720
 aacagtttca gaaggaatgg taccagctcc tctttgtatt tctggtagaa ttcagctgtg 3780
 aatccatctg gtccctgggt ttttttgggt ggtagtctat taattactgc ctccattcca 3840
 gagcttgcta ctggtctagt cagggattca acttcttctt ggttttagtct tgggtgatgc 3900
 atccaggaat gtatccattt ctctagatt ttctagtta tttgcataga agagtata 3960
 gtattatctg tgggtatttt gtatttctgt ggggtcagtg gtgatatccc ctttatcatt 4020
 ttttttgtgt ctatttgatt ctctctgtc tcttcttta tttctctagc tagtggata 4080
 tttgttatt tattttattt tttaaaaaa acggctcctg gatgtgttga ttttttttgg 4140
 agggcttttt gtgtctttgt ctcttcagt tcttctctga tcttagttat ttcttgcctt 4200
 ctgccagctt ttggattagt ttgctcttgc ctctctagct cttttaattg tgatgttagg 4260
 gtgaogattt gagatcttcc tggctttcta atgtgggcat ttagtgctat gaattttcct 4320
 cttaacactg ctttagttgt gtcccagaga ttctggtaca ttgtctctgt tctcatttgt 4380
 ttcaaagaac ttatttattt ctgccttaat ttcattattt acccaggagc cattcaggag 4440
 caagttgttc aatttccagg aaattgtgtg gttttgagtg agtttcttaa tcttgggttc 4500
 taatttgatt gctctgtggt ctgagagact gtttgttatg atttcagctc ttttgcattt 4560
 gctgaggagt gttttacttc caattatgtg gtagatttta gaataagtac catgtggcac 4620
 tcagaagaat gtatattctg ttgatttggg ctagaaagtt ctgtagacat ctactaggtc 4680
 cacttgatcc agagctaagt tcaagtcctg aatatecttg ttaattttct gtcttgttga 4740
 tctgtctaact actggcagtg ggggtttgaa gtttcccact actattgctg ggcagtctaa 4800
 gtctctttgt aggtctctaa gaacttactt tgtgagctg ggtgctcttg tattgggtgc 4860
 atatatattc agaatagttt actcttcttg ttgaattgtt ccctttacca ttatataatg 4920
 cccttctttg tctattttga tctttgttgg tttaaagtct gttttgtcag agactaggat 4980
 tgcaaccctc tttttttttt tttttgctt ccatatgctt ggtaaatttt cctcaatccc 5040
 tttattttga gcctgtgtgt gtctttgcat gtaagataga tctcctgaat acaacacacc 5100

ES 2 637 174 T3

aatgggtcct gactccttat ccaatttgcc agtctgtatc ttttaattgg ggcatttagc 5160
 ccctttacat ttaaggtagg tattgttatg tgagtttgat cctgtcacca tgatgctatt 5220
 tggttatfff gcatgctagt tgatgcagtt tcttcatagt gtcattgato tttatagttt 5280
 ggtgtgtfff tgcaatggct ggtaccagtt tttcctttcc atatttagtg cttatttcag 5340
 gagctgttgc agggcaggcc tgggtggaac aaaatccctc agcatttgct tgtctggaaa 5400
 ggattttatt tctccttcac ttatgaagct tagtttggct ggatatgaaa ttctgggttg 5460
 aaaattcttt tctttaagaa tgttgatggt ggcctccaat ctcttctggg ttgtagggtt 5520
 tatgttgaga ggtccactgt tagtctgatg ggcgtccctt tgtaggtaac ctggcctttc 5580
 tctctggctg cccttaacag tttttacttg atttcaacct tggagaatct gatgattatg 5640
 tgtcttgggg ttgatcttct cgtggagtat cttaatgggt ttctctgtgt ttgccgaatt 5700
 tgcattgttg cctgtcttgc taggttgggg aagttctcct ggataatata ccgaagggtg 5760
 tttccacag tgtttccatt ttcccatct cctcctggta ctccaagcta tcataggttc 5820
 agtcttttta tgaagtctca ttttcttgg aggccttatt cattcctttt cattcttttt 5880
 tctctcttct tgtcagcatg tcttatttca ataaggtagt ctccaactc tgatatcttc 5940
 tcttccactt ggtcgattca gctgttgaca ctgtgtatg cttaacgaag ttcttgtgct 6000
 gtgtttttca gcccacatcag gccatttgtg ttcctctcta aactgattat tctagtttagc 6060
 aattcctcca actttttatc aaggttctta gcttcttgc attgggttag aacatactcc 6120
 tttagctcat catagttttt totaccatc ttgtgaagcc tacttctgtc agttcatcca 6180
 tctgatcctc cgcctcgttc tgcacctta atggagacat tgtgatcatt tagaggagaa 6240
 gaggcactct ggccttttgg gttttcagca ttttttcat tggttctttc tcacctcgt 6300
 gagtttgtct agtttgggtc tttgagctg ctgaccttg tatgggtttt ttgtgggggc 6360
 ccttgttgtt gttgttgatg atgatgctgt tgttgtcact ttctgcttat ttgtttttct 6420
 ttcaatagtc acttccctct tetgtagggc tgcctcagtt tgcctgggtt cactttaggc 6480
 cttattcctc tgatttctc ccacgcctgg atatgtaact caaggaggct ggagagcagc 6540
 aaaaatgggt gtctgtcctc tcttctggga cctctgactt caaggggac caacctgatg 6600
 ccagtaggat cgctcctgta taggtgtcc tgacaatccc tgttggaggg tctcaccag 6660
 ttgggtggca ccaggaggag gaccattta acgaagcact ttgtccctg gtggagaggg 6720
 tgtgttttgc tgtgggaaag cccacttctc tgggcttccc agattcctca gaactaccag 6780
 gaggagaggg taagtctgtt ggtccgcaga gactgcagcc acccctccc ctaggggctc 6840
 agcccaggg agatctgaat tctgtccctg agcctctggc tgcagttact gaagattctg 6900
 caggaagcc ccaccactg aggaaggatg ggtgaggggt agacctgaag aggcactctg 6960
 gccgtgact acccagctg gtgtgttggg ttgtggcgac aagtcttggg accaagctgt 7020

ES 2 637 174 T3

ccagcctcgc tggctcccgc aggggaaaag cacagcctgg agctatagaa atggatgctg 7080
catttctccc cgcgcgccag ggagattagc gtgttaggca gttgggagtc ccagtgcctg 7140
ctgctgcccc tccctcaagg agctcaaagg gcttagacag caggcagcag aagcctgtgc 7200
tggtcacccc tccccaggg agttcagtaa gcttaggcag attccagctg agaggccata 7260
agaatctgta cattctaggg ttgggatgct aggcctcggg ggcattgggat cgagagtggg 7320
atcttccaat ccatgagttg cacagttctt tggaaaagca atttccccg ctgggtagcc 7380
tgctcgctcg ccgctcccct tggctggagg ggagggggtt ccccttcccc gtgtggttct 7440
caggtgggct cactgctctt ccttctctct gtgggtcacg ccagccttct agtcaatttt 7500
gatgagcgaa tctagatacc ttgccgtga aggactcaca cacttattat ggtttttttc 7560
aataggaacc tctgaacgga gttgcttcta gtcggccatc ttggccccgc ctctgaatat 7620
ttctttaatg ttgtctttcc tcttaataata ttctgtagaa agatttcagt gcagaagatt 7680
aatacttcaa acatatcaac caatattttc tttttttccc taaag 7725

<210> 15
<211> 2914
5 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Nucleótido Sintético

<400> 15
gtatgtgtgt ttgcaaagta cttgtaaatg acaaagaact aagaagataa ttataaagta 60
atcaaaaagta aactatttta tgcaaagtga tttatataca aacacaaaga tctttagtta 120
aaggactcac atgcatcatt acgttctttg ctcaattcct agacgttggg cttggcatgc 180
taattataaa cagatcacgt cattctcaga aatctctaac tgctcattga cactttatgg 240
aaattgtttg atcataggct catgcaacca gtattaactt aatatcagtt ttgtttaaaa 300
agcttagctg atgtttaatg ttaaataatg atggcatgta aattcctgat gataatttgc 360
tttagcaagg tgaatactct ctagtgagaa atggtgatga agtagatatt tctcactg 420
taaaattagg tcaggttctg aaatggtctg aagtgtagag gtcacacagg attctgtatt 480
cattgggaag attacagttt gcaatgtgtt cccagggact gaaaacacac cgtcgatgaa 540
aaccagccac tgatgaacag cctcagacct ggccagtacg gggagcacgt gaaccataac 600
tggcttagaa ggactgattt catgccaact tgaggggaga attccaaatt ccaaagacac 660
tcctctcaca ggactatgaa accatctttt aagaagttcc aaggacaaaa gtcacttcca 720
taattatagt cctggcaact tgatctttag atctattttt gcttcatctg gctctggcat 780
tcccataacc ttaaaaaatg ttctgttca tactagagaa ttcccttggc ccttatttct 840

ES 2 637 174 T3

aattgaaacc tccttgaagt ttctgttgct gcttttcatg cagagtgaaa tacattctaa 900
cctgcagaac tgtcttgggtg gtttgtgact gtaatgatgt tcatcaatca ggtcacacat 960
caggtttttg ctaggacctc ttttgtgtgt taccctgagt aacaccttaa gtgctactaa 1020
aatgactcca tctaaatact ttgcatactc ettgctccag gtctccactg tcaggacata 1080
gactatagga tgactgaatg attgttgtaa cttcagtgtc tcaaaataag tccttcagtc 1140
aggacactct agttagactc tgtgtactca ctgatggggt agtggaagtg caaagtgcac 1200
gaacttggga gttgaacaag ccttattagt ttccaagggt tgccacaata aaggaccacc 1260
aactgggtgg ettgaacag tagacattta ttettacagc tctagagggt agaagtctga 1320
aaccaacgta tcagcgggac tgcttgttct gatggttcta gggcagaatc catctttgcc 1380
tcttagcttc tggcgtttac tggcagtcct tggattcct tggctcgtag gtgcatcact 1440
gtcatcatca cctcctgcat cacaagggtg tctctgtgtc caaatttccc tcttcttatg 1500
caagtgccag tcattggatt agggccacc ctaaactact atgacctcat ctttaactga 1560
ttacatttgt caagatctta tttctaaaca aggtcacatt aaaatattct gagtgggtat 1620
gaattttggg aggacatgac tcaatccagt acacaaacca tgtttaaatg cttgttcttt 1680
tccttttttg aacttaagtt tcctcatctg taaaatggag atgataatat ctatcttacc 1740
tctttaagct gttgtggact cagtgaatta aaacaacggt atgtaaagcc ccagtacagt 1800
atggtgtaaa tagaagggtg tcaaccaaca tcagaattct tctttctttt ctcaatggcc 1860
attgtgtaga gccacttcac aaattctcaa gggcctcttt cttttggatc agagttgttt 1920
ggttaaacag tgaaatggcc aatgctaaag gtgagacgtc acaaaatgtg taaaaaact 1980
ctgtcctaact gctttgctca ggatggctct taaagggacc ctcagctccg ggaacagct 2040
gtgaccaact ctgctgccct gctgctccc atgttcttac cctttccctg cctcttatga 2100
gggccagcct tcactctctg ttggtcttca gaaggatgag tcaattagca ggaatagaac 2160
cagattctcc cacatatccc taagcttacc gtggattggc accaagctct aaaactattg 2220
cggctcgaag agtttcagac ctgaaatatt cttcattggt agagaagaca taatggaaga 2280
ccttgagctt gcctttgatg attctgtaaa aagtcattcc agttatgtct ttggaacca 2340
gcccttgtgc tccttccatg tttcaaatga aaaacaattg gattgacttt gaggtggaat 2400
gtaggtcaat acaaaaggaa gcaacgagcc tcagaatctc agatataatg ataactttgg 2460
tagctgaact gtcacacttt ccttatcaat tttgtattct gtattttatt gaaatatggc 2520
ataagtaaac tacaataat gtaaaagact gaaaattgag aaaatggaaa ctcccagtt 2580
aaaaatcatg gaataattgt cttatagggt tggaattctg gagaaagttt acccatgctg 2640
ttagtatagg aaaaaggtag tcagctctct cttcaccact gattactcac agttttcttg 2700
gtgggctgag ttaattggct ccagcctca ctaggatcac tataaaacca tgctgttagc 2760
atctgtgttg ccagattatg ggagaggaat gaggtcaagg gtaaattgtg ccaaaggaca 2820
ctctctggcg ttcagtcact aagaagatct atgaacaact agaaataaca ggtatattgt 2880
catgtatatt ttctgtattt attatttttt gcag 2914

- 5 <210> 16
- <211> 3030
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial

ES 2 637 174 T3

<220>

<223> Nucleótido Sintético

5 <400> 16
atgtcggcgg gcggtccatg cccagcagca gccggagggg gccaggggg cgcctcctgc 60
tccgtggggg cccctggcgg ggtatccatg ttccgggtgc tggaggtgct ggagaaggag 120
ttcgacaaaag cttttgtgga tgtggatctg ctctggggag agatcgatcc agaccaagcg 180
gacatcactt atgaggggcg acagaagatg accagcctga gctcctgctt tgcacagctt 240
tgccacaaaag cccagtctgt gtctcaaatac aaccacaagc tggaggcaca gttggtggat 300
ctgaaatctg aactgacaga aacccaagca gagaaagttg ttttggagaa agaagtacat 360
gatcagcttt tacagctgca ctctattcag ctgcagcttc atgctaaaac tgggtcaaagt 420
gctgactctg gtaccattaa ggcaaaattg gaaagagagc ttgaggcaaa caaaaaagaa 480
aaaatgaaag aagcacaaact tgaagctgaa gtgaaattgt tgagaaaaga gaatgaagcc 540
cttcgtagac atatagctgt tctccaggct gaagtatatg gggcgagact agctgccaag 600
tacttgata aggaactggc aggaagggtc caacagatac aattgctagg acgagatatg 660
aaggacctg ctcatgataa gctttggaac caattagaag ctgaaataca tttgcatcgt 720
cacaaaactg tgatccgagc ctgcagagga cgtaatgact tgaaacgacc aatgcaagca 780
ccaccaggcc atgatcaaga ttccctaaag aaaagccaag gtgttggtcc aattagaaa 840
gttctcctcc ttaaggaaga tcatgaagc cttggcattt caattacagg tgggaaagaa 900
catggtgttc caatcctcat ctctgagatc catccggggc aacctgctga tagatgcgga 960
gggctgcacg ttggggatgc tattttggca gtcaacggag ttaacctaaag ggacacaaaag 1020
cataaagaag ctgtaactat tctttctcag cagagaggag agattgaatt tgaagtagtt 1080
tatgtggctc ctgaagtgga ttctgatgat gaaaacgtag agtatgaaga tgagagtgga 1140
catcgttacc gtttgtacct tgatgagtta gaaggaggtg gtaaccctgg tgctagtgtc 1200
aaagacaaa gtggggaaat caaagtatta caagctggag tcccaaataa accaggcatt 1260
cccaaattac tagaaggggag taaaattca atacagtggg agaaagctga agataatgga 1320
tgtagaatta catactatat ccttgagata agaaagagca cttcaaataa tttacagaac 1380

ES 2 637 174 T3

cagaatttaa ggtggaagat gacatttaat ggatcctgca gtagtgtttg cacatggaag 1440
 tccaaaaacc tgaaggaat atttcagttc agagtagtag ctgcaaataa tctagggttt 1500
 ggtgaatata gtggaatcag tgagaatatt atattagttg gagatgattt ttggatacca 1560
 gaaacaagtt tcatacttac tattatagtt ggaatatttc tggttgttac aatcccactg 1620
 acctttgtct ggcatagaag attaaagaat caaaaaagtg ccaaggaag ggtgacagtg 1680
 cttataaacg aagacaaaga gttggctgag ctgcgaggtc tggcagccgg agtaggcctg 1740
 gctaatacct gctatgcaat acatactctt ccaacccaag aggagattga aaatcttctt 1800
 gccttccctc gggaaaaact gactctgctg ctcttgctgg gaagtggagc ctttgagaa 1860
 gtgtatgaag gaacagcagt ggacatctta ggagttgaa gtggagaaat caaagtagca 1920
 gtgaagactt tgaagaaggg ttccacagac caggagaaga ttgaattcct gaaggaggca 1980
 catctgatga gcaaatttaa tcatcccaac attctgaagc agcttgaggt ttgtctgctg 2040
 aatgaacccc aatacattat cctggaactg atggagggag gagaccttct tacttatttg 2100
 cgtaaagccc ggtaggcaac gttttatggt cctttactca ccttggttga ccttgtagac 2160
 ctgtgtgtag atatttcaaa aggctgtgct tacttggaac ggatgcattt cattcacagg 2220
 gatctggcag ctagaattg ccttgtttcc gtgaaagact ataccagtcc acggatagtg 2280
 aagattggag actttggact cgccagagac atctataaaa atgattacta tagaaagaga 2340
 ggggaaggcc tgctcccagt tcggtgatg gctccagaaa gtttgatgga tggaatcttc 2400
 actactcaat ctgatgatg gtcttttga attctgattt gggagatttt aactcttgg 2460
 catcagcctt atccagctca ttccaacctt gatgtgttaa actatgtgca aacaggagg 2520
 agactggagc caccaagaaa ttgtcctgat gatctgtgga atttaatgac ccagtgtgg 2580
 gctcaagaac cggaccaaag acctactttt catagaattc aggaccaact tcagttattc 2640
 agaaattttt tcttaaatag catttataag tccagagatg aagcaaacia cagtggagtc 2700
 ataaatgaaa gctttgaagg tgaagatggc gatgtgattt gtttgaattc agatgacatt 2760
 atgccagttg ctttaatgga aacgaagaac cgagaagggt taaactatat ggtacttgc 2820
 acagaatgtg gccaaagtga agaaaagtct gaggtctctc taggctcca ggaatctgaa 2880
 tcttggtgct tgaggaaaga agagaaggaa ccacatgcag acaaagattt ctgccaagaa 2940
 aaacaagtgg ctactgcc ttctggcaag cctgaaggcc tgaactatgc ctgtctcact 3000
 cacagtggat atggagatgg gtctgattaa 3030

<210> 17
 <211> 1009
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

10

<400> 17

ES 2 637 174 T3

Met Ser Ala Gly Gly Pro Cys Pro Ala Ala Ala Gly Gly Gly Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ala Ser Cys Ser Val Gly Ala Pro Gly Gly Val Ser Met Phe Arg
 20 25 30

Trp Leu Glu Val Leu Glu Lys Glu Phe Asp Lys Ala Phe Val Asp Val
 35 40 45

Asp Leu Leu Leu Gly Glu Ile Asp Pro Asp Gln Ala Asp Ile Thr Tyr
 50 55 60

Glu Gly Arg Gln Lys Met Thr Ser Leu Ser Ser Cys Phe Ala Gln Leu
 65 70 75 80

Cys His Lys Ala Gln Ser Val Ser Gln Ile Asn His Lys Leu Glu Ala
 85 90 95

Gln Leu Val Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Glu Thr Gln Ala Glu Lys
 100 105 110

Val Val Leu Glu Lys Glu Val His Asp Gln Leu Leu Gln Leu His Ser
 115 120 125

Ile Gln Leu Gln Leu His Ala Lys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Ser Gly
 130 135 140

Thr Ile Lys Ala Lys Leu Glu Arg Glu Leu Glu Ala Asn Lys Lys Glu
 145 150 155 160

Lys Met Lys Glu Ala Gln Leu Glu Ala Glu Val Lys Leu Leu Arg Lys
 165 170 175

Glu Asn Glu Ala Leu Arg Arg His Ile Ala Val Leu Gln Ala Glu Val
 180 185 190

Tyr Gly Ala Arg Leu Ala Ala Lys Tyr Leu Asp Lys Glu Leu Ala Gly
 195 200 205

Arg Val Gln Gln Ile Gln Leu Leu Gly Arg Asp Met Lys Gly Pro Ala
 210 215 220

His Asp Lys Leu Trp Asn Gln Leu Glu Ala Glu Ile His Leu His Arg
 225 230 235 240

ES 2 637 174 T3

His Lys Thr Val Ile Arg Ala Cys Arg Gly Arg Asn Asp Leu Lys Arg
 245 250 255
 Pro Met Gln Ala Pro Pro Gly His Asp Gln Asp Ser Leu Lys Lys Ser
 260 265 270
 Gln Gly Val Gly Pro Ile Arg Lys Val Leu Leu Leu Lys Glu Asp His
 275 280 285
 Glu Gly Leu Gly Ile Ser Ile Thr Gly Gly Lys Glu His Gly Val Pro
 290 295 300
 Ile Leu Ile Ser Glu Ile His Pro Gly Gln Pro Ala Asp Arg Cys Gly
 305 310 315 320
 Gly Leu His Val Gly Asp Ala Ile Leu Ala Val Asn Gly Val Asn Leu
 325 330 335
 Arg Asp Thr Lys His Lys Glu Ala Val Thr Ile Leu Ser Gln Gln Arg
 340 345 350
 Gly Glu Ile Glu Phe Glu Val Val Tyr Val Ala Pro Glu Val Asp Ser
 355 360 365
 Asp Asp Glu Asn Val Glu Tyr Glu Asp Glu Ser Gly His Arg Tyr Arg
 370 375 380
 Leu Tyr Leu Asp Glu Leu Glu Gly Gly Gly Asn Pro Gly Ala Ser Cys
 385 390 395 400
 Lys Asp Thr Ser Gly Glu Ile Lys Val Leu Gln Ala Gly Val Pro Asn
 405 410 415
 Lys Pro Gly Ile Pro Lys Leu Leu Glu Gly Ser Lys Asn Ser Ile Gln
 420 425 430
 Trp Glu Lys Ala Glu Asp Asn Gly Cys Arg Ile Thr Tyr Tyr Ile Leu
 435 440 445
 Glu Ile Arg Lys Ser Thr Ser Asn Asn Leu Gln Asn Gln Asn Leu Arg
 450 455 460
 Trp Lys Met Thr Phe Asn Gly Ser Cys Ser Ser Val Cys Thr Trp Lys
 465 470 475 480
 Ser Lys Asn Leu Lys Gly Ile Phe Gln Phe Arg Val Val Ala Ala Asn
 485 490 495

ES 2 637 174 T3

Asn Leu Gly Phe Gly Glu Tyr Ser Gly Ile Ser Glu Asn Ile Ile Leu
 500 505 510

Val Gly Asp Asp Phe Trp Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile Leu Thr Ile
 515 520 525

Ile Val Gly Ile Phe Leu Val Val Thr Ile Pro Leu Thr Phe Val Trp
 530 535 540

His Arg Arg Leu Lys Asn Gln Lys Ser Ala Lys Glu Gly Val Thr Val
 545 550 555 560

Leu Ile Asn Glu Asp Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Gly Leu Ala Ala
 565 570 575

Gly Val Gly Leu Ala Asn Ala Cys Tyr Ala Ile His Thr Leu Pro Thr
 580 585 590

Gln Glu Glu Ile Glu Asn Leu Pro Ala Phe Pro Arg Glu Lys Leu Thr
 595 600 605

Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly
 610 615 620

Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val Ala
 625 630 635 640

Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe
 645 650 655

Leu Lys Glu Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile Leu
 660 665 670

Lys Gln Leu Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu
 675 680 685

Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg
 690 695 700

Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val Asp
 705 710 715 720

Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met His
 725 730 735

Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Val Lys

ES 2 637 174 T3

740 745 750

Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
755 760 765

Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly Leu
770 775 780

Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile Phe
785 790 795 800

Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu Ile
805 810 815

Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp Val
820 825 830

Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys
835 840 845

Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro
850 855 860

Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe
865 870 875 880

Arg Asn Phe Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn
885 890 895

Asn Ser Gly Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val
900 905 910

Ile Cys Leu Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr
915 920 925

Lys Asn Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly
930 935 940

Gln Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu
945 950 955 960

Ser Cys Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Asp
965 970 975

Phe Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu
980 985 990

Gly Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser
995 1000 1005

Asp

- 5 <210> 18
 <211> 2175
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 637 174 T3

<220>

<223> Nucleótido Sintético

5 <400> 18
atggctccct ggcctgaatt gggagatgcc cagcccaacc ccgataagta cctcgaaggg 60
gccgcaggtc agcagcccac tgcccctgat aaaagcaaag agaccaacaa aacagataac 120
actgaggcac ctgtaaccaa gattgaactt ctgccgtcct actccacggc tacactgata 180
gatgagccca ctgagggtga tgaccctgg aacctacca ctcttcagga ctcggggatc 240
aagtggtcag agagagacac caaaggaag attctctggt tcttccaagg gattgggaga 300
ttgatattac ttctcggatt tctctacttt ttcgtgtgct ccctggatat tcttagtagc 360
gccttcacgc tggttggagc tggagtccca aataaaccag gcattccca attactagaa 420
gggagtaaaa attcaataca gtgggagaaa gctgaagata atggatgtag aattacatac 480
tatatccttg agataagaaa gagcacttca aataatttac agaaccagaa ttaaggtgg 540
aagatgacat ttaatggatc ctgcagtagt gtttgcacat ggaagtccaa aaacctgaaa 600
ggaatatttc agttcagagt agtagctgca aataatctag ggtttggga atatagtga 660
atcagtgaga atattatatt agttggagat gatttttggga taccagaaac aagtttcata 720
cttactatta tagttggaat atttctggtt gttacaatcc cactgacctt tgtctggcat 780
agaagattaa agaatcaaaa aagtgccaaag gaaggggtga cagtgcctat aaacgaagac 840
aaagagttgg ctgagctgcg aggtctggca gccggagtag gcctggctaa tgctgctat 900
gcaatacata ctcttccaac ccaagaggag attgaaaatc ttctgcctt ccctcgggaa 960
aaactgactc tgcgtctcct gctgggaagt ggagcctttg gagaagtgt tgaaggaaca 1020
gcagtgagca tcttaggagt tggaagtgga gaaatcaaag tagcagtga gactttgaa 1080
aagggtcca cagaccagga gaagattgaa ttctgaagg aggcacatct gatgagcaa 1140
ttaaatacct ccaacattct gaagcagctt ggagtttgtc tgctgaatga accccaatac 1200
attatcctgg aactgatgga gggaggagac ctcttactt atttgcgtaa agcccggatg 1260
gcaacgtttt atggctcctt actcaccttg gttgacctg tagacctgtg tgtagatatt 1320
tcaaaaggct gtgtctactt ggaacggatg catttcattc acagggatct ggcagctaga 1380

ES 2 637 174 T3

aattgccttg tttcogtgaa agactatacc agtccacgga tagtgaagat tggagacttt 1440
 ggactcgcca gagacatcta taaaaatgat tactatagaa agagagggga aggcctgctc 1500
 ccagttcggg ggatggctcc agaaagtttg atggatggaa tcttcactac tcaatctgat 1560
 gtatggtcct ttggaattct gatttgggag attttaactc ttggtcatca gccttatcca 1620
 gctcattcca accttgatgt gttaaactat gtgcaaacag gagggagact ggagccacca 1680
 agaaattgct ctgatgatct gtggaattta atgaccaggt gctgggctca agaaccgac 1740
 caaagaccta cttttcatag aattcaggac caacttcagt tattcagaaa ttttttctta 1800
 aatagcattt ataagtccag agatgaagca aacaacagtg gagtcataaa tgaaagcttt 1860
 gaaggatgaag atggcgatgt gatttgtttg aattcagatg acattatgcc agttgcttta 1920
 atggaacga agaaccgaga agggttaaac tatatggtac ttgctacaga atgtggccaa 1980
 ggtgaagaaa agtctgaggg tctcttaggc tcccaggaat ctgaatcttg tggctgagg 2040
 aaagaagaga aggaaccaca tgcagacaaa gatttctgcc aagaaaaaca agtggcttac 2100
 tgccttctg gcaagcctga aggcctgaac tatgcctgtc tcaactcacag tggatatgga 2160
 gatgggtctg attaa 2175

<210> 19
 <211> 724
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

10

<400> 19
 Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Gly Asp Ala Gln Pro Asn Pro Asp Lys
 1 5 10 15
 Tyr Leu Glu Gly Ala Ala Gly Gln Gln Pro Thr Ala Pro Asp Lys Ser
 20 25 30
 Lys Glu Thr Asn Lys Thr Asp Asn Thr Glu Ala Pro Val Thr Lys Ile
 35 40 45
 Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Thr Ala Thr Leu Ile Asp Glu Pro Thr
 50 55 60
 Glu Val Asp Asp Pro Trp Asn Leu Pro Thr Leu Gln Asp Ser Gly Ile
 65 70 75 80
 Lys Trp Ser Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys Ile Leu Cys Phe Phe Gln
 85 90 95

ES 2 637 174 T3

Gly Ile Gly Arg Leu Ile Leu Leu Leu Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Val
 100 105 110

Cys Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ser Ala Phe Gln Leu Val Gly Ala Gly
 115 120 125

Val Pro Asn Lys Pro Gly Ile Pro Lys Leu Leu Glu Gly Ser Lys Asn
 130 135 140

Ser Ile Gln Trp Glu Lys Ala Glu Asp Asn Gly Cys Arg Ile Thr Tyr
 145 150 155 160

Tyr Ile Leu Glu Ile Arg Lys Ser Thr Ser Asn Asn Leu Gln Asn Gln
 165 170 175

Asn Leu Arg Trp Lys Met Thr Phe Asn Gly Ser Cys Ser Ser Val Cys
 180 185 190

Thr Trp Lys Ser Lys Asn Leu Lys Gly Ile Phe Gln Phe Arg Val Val
 195 200 205

Ala Ala Asn Asn Leu Gly Phe Gly Glu Tyr Ser Gly Ile Ser Glu Asn
 210 215 220

Ile Ile Leu Val Gly Asp Asp Phe Trp Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Ile Val Gly Ile Phe Leu Val Val Thr Ile Pro Leu Thr
 245 250 255

Phe Val Trp His Arg Arg Leu Lys Asn Gln Lys Ser Ala Lys Glu Gly
 260 265 270

Val Thr Val Leu Ile Asn Glu Asp Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Gly
 275 280 285

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

Leu Pro Thr Gln Glu Glu Ile Glu Asn Leu Pro Ala Phe Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Lys Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val
 325 330 335

Tyr Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile
 340 345 350

ES 2 637 174 T3

Lys Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys
 355 360 365

Ile Glu Phe Leu Lys Glu Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro
 370 375 380

Asn Ile Leu Lys Gln Leu Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr
 385 390 395 400

Ile Ile Leu Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg
 405 410 415

Lys Ala Arg Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp
 420 425 430

Leu Val Asp Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu
 435 440 445

Arg Met His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val
 450 455 460

Ser Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe
 465 470 475 480

Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly
 485 490 495

Glu Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp
 500 505 510

Gly Ile Phe Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile
 515 520 525

Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn
 530 535 540

Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro
 545 550 555 560

Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala
 565 570 575

Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu
 580 585 590

Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp
 595 600 605

ES 2 637 174 T3

Glu Ala Asn Asn Ser Gly Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp
 610 615 620

Gly Asp Val Ile Cys Leu Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu
 625 630 635 640

Met Glu Thr Lys Asn Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr
 645 650 655

Glu Cys Gly Gln Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln
 660 665 670

Glu Ser Glu Ser Cys Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala
 675 680 685

Asp Lys Asp Phe Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly
 690 695 700

Lys Pro Glu Gly Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly
 705 710 715 720

Asp Gly Ser Asp

<210> 20

<211> 1866

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Nucleótido Sintético

10

<400> 20

atggctccct	ggcctgaatt	gggagatgcc	cagcccaacc	ccgataagta	cctcgaaggg	60
gccgcaggtc	agcagccac	tgcccctgat	aaaagcaaag	agaccaacaa	aacagataac	120
actgaggcac	ctgtaaccaa	gattgaactt	ctgccgtcct	actccacggc	tacactgata	180
gatgagccca	ctgaggtgga	tgaccctgg	aacctacca	ctcttcagga	ctcggggatc	240
aagtggtcag	agagagacac	caaaggaag	attctctggt	tcttccaagg	gattgggaga	300
ttgattttac	ttctcggatt	tctctacttt	ttcgtgtgct	ccctggatat	tcttagtagc	360
gccttcacgc	tggttgaga	tgatttttgg	ataccagaaa	caagtttcat	acttactatt	420
atagttggaa	tatttctggt	tgttacaatc	ccactgacct	ttgtctggca	tagaagatta	480
aagaatcaaa	aaagtgccaa	ggaaggggtg	acagtgctta	taaacgaaga	caaagagttg	540
gctgagctgc	gaggtctggc	agccggagta	ggcctggcta	atgcctgcta	tgcaatacat	600

ES 2 637 174 T3

actcttccaa cccaagagga gattgaaaat cttcctgcct tccctcggga aaaactgact 660
 ctgcgtctct tgctgggaag tggagccttt ggagaagtgt atgaaggaac agcagtggac 720
 atcttaggag ttggaagtgg agaaatcaaa gtagcagtga agactttgaa gaagggttcc 780
 acagaccagg agaagattga attcctgaag gaggcacatc tgatgagcaa atttaatcat 840
 cccaacattc tgaagcagct tggagtttgt ctgctgaatg aacccaata cattatcctg 900
 gaactgatgg agggaggaga ccttcttact tatttgcgta aagcccggat ggcaacgttt 960
 tatggtcctt tactcacctt ggttgacctt gtagacctgt gtgtagatat ttcaaaaggc 1020
 tgtgtctact tggaacggat gcatttcatt cacagggatc tggcagctag aaattgcctt 1080
 gtttccgtga aagactatac cagtccacgg atagtgaaga ttggagactt tggactcggc 1140
 agagacatct ataaaaatga ttactataga aagagagggg aaggcctgct ccagttcgg 1200
 tggatggctc cagaaagttt gatggatgga atcttcaact ctcaatctga tgtatggtct 1260
 tttggaattc tgatttggga gattttaact cttggtcatc agccttatcc agctcattcc 1320
 aacctgatg tgttaaacta tgtgcaaaca ggaggagac tggagccacc aagaaattgt 1380
 cctgatgatc tgtggaattt aatgaccag tgcctggctc aagaaccga ccaaagacct 1440
 acttttcata gaattcagga ccaacttcag ttattcagaa attttttctt aaatagcatt 1500
 tataagtcca gagatgaagc aaacaacagt ggagtcataa atgaaagctt tgaaggtgaa 1560
 gatggcgatg tgatttgttt gaattcagat gacattatgc cagttgcttt aatgaaacg 1620
 aagaaccgag aagggttaaa ctatatggta cttgctacag aatgtggcca aggtgaagaa 1680
 aagtctgagg gtcctctagg ctcccaggaa tctgaatctt gtggtctgag gaaagaagag 1740
 aaggaaccac atgcagacaa agatttctgc caagaaaaac aagtggctta ctgcccttct 1800
 ggcaagcctg aaggcctgaa ctatgcctgt ctactcaca gtggatatgg agatgggtct 1860
 gattaa 1866

<210> 21
 <211> 621
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

10 <400> 21
 Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Gly Asp Ala Gln Pro Asn Pro Asp Lys
 1 5 10 15
 Tyr Leu Glu Gly Ala Ala Gly Gln Gln Pro Thr Ala Pro Asp Lys Ser
 20 25 30

ES 2 637 174 T3

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

ES 2 637 174 T3

Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu Glu Leu Met Glu
 290 295 300

Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg Met Ala Thr Phe
 305 310 315 320

Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val Asp Leu Cys Val Asp
 325 330 335

Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met His Phe Ile His Arg
 340 345 350

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Val Lys Asp Tyr Thr Ser
 355 360 365

Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr
 370 375 380

Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly Leu Leu Pro Val Arg
 385 390 395 400

Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile Phe Thr Thr Gln Ser
 405 410 415

Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly
 420 425 430

His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val
 435 440 445

Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu
 450 455 460

Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro
 465 470 475 480

Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe
 485 490 495

Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn Asn Ser Gly Val
 500 505 510

Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val Ile Cys Leu Asn
 515 520 525

Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr Lys Asn Arg Glu
 530 535 540

ES 2 637 174 T3

Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly Gln Gly Glu Glu
545 550 555 560

Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu Ser Cys Gly Leu
565 570 575

Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Asp Phe Cys Gln Glu
580 585 590

Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu Gly Leu Asn Tyr
595 600 605

Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser Asp
610 615 620

<210> 22
<211> 1782
5 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Nucleótido Sintético

<400> 22
atggctccct ggcctgaatt gggagatgcc cagcccaacc ccgataagta cctcgaagg 60
gccgcaggtc agcagcccac tgcccctgat aaaagcaaag agaccaaca aacagataac 120
actgaggcac ctgtaaccaa gattgaactt ctgccgtcct actccacggc tacactgata 180
gatgagccca ctgagggtga tgacccttgg aacctaccca ctcttcagga ctcggggatc 240
aagtggtcag agagagacac caaaggaag attctctgtt tcttccaagg gattgggaga 300
ttgattttac ttctcggatt tctctacttt tctgtgtgct ccttgatata tcttagtagc 360
gccttccagc tggttggagt ctggcataga agattaaaga atcaaaaaag tgccaaggaa 420
gggtgacag tgcttataaa cgaagacaaa gagttggctg agctgcgagg tctggcagcc 480
ggagtaggcc tggctaatac ctgctatgca atacatactc ttccaacca agaggagatt 540
gaaaatcttc ctgccttccc tcgggaaaaa ctgactctgc gtctcttgct gggaagtgga 600
gcctttggag aagtgtatga aggaacagca gtggacatct taggagttgg aagtggagaa 660
atcaaagtag cagtgaagac tttgaagaag ggtccacag accaggagaa gattgaattc 720
ctgaaggagg cacatctgat gagcaaattt aatcatocca acattctgaa gcagcttggg 780
gtttgtctgc tgaatgaacc ccaatacatt atcctggaac tgatggaggg aggagacctt 840
cttacttatt tgcgtaaagc ccggatggca acgttttatg gtcctttact caccttggtt 900
gacctttagt acctgtgtgt agatatttca aaaggctgtg tctacttggg acggatgcat 960

ES 2 637 174 T3

ttcattcaca gggatctggc agctagaat tgccttgtt ccgtaaga ctataccagt 1020
 ccacggatag tgaagattgg agactttgga ctccagag acatctataa aaatgattac 1080
 tatagaaaga gagggaagg cctgctccca gttcgggga tggctccaga aagtttgatg 1140
 gatggaatct tcactactca atctgatgta tggcttttg gaattctgat ttgggagatt 1200
 ttaactcttg gtcacagcc ttatccagct cattccaacc ttgatgtgtt aaactatgtg 1260
 caaacaggag ggagactgga gccaccaaga aattgtctg atgatctgtg gaatttaatg 1320
 acccagtgtt gggctcaaga acccgaccaa agacctactt ttcatagaat tcaggaccaa 1380
 cttcagttat tcagaaatth tttcttaaat agcatttata agtcagaga tgaagcaaac 1440
 aacagtggag tcataaatga aagctttgaa ggtgaagatg gcgatgtgat ttgtttgaat 1500
 tcagatgaca ttatgccagt tgctttaatg gaaacgaaga accgagaagg gttaaactat 1560
 atgttacttg ctacagaatg tggccaaggt gaagaaaagt ctgaggggtcc tctaggctcc 1620
 caggaatctg aatcttggg tctgaggaaa gaagagaagg aaccacatgc agacaaagat 1680
 ttctgccaag aaaaacaagt ggcttactgc cttctggca agcctgaagg cctgaactat 1740
 gcctgtctca ctacagtg atatggagat ggtctgatt aa 1782

<210> 23
 <211> 593
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

10

<400> 23
 Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Gly Asp Ala Gln Pro Asn Pro Asp Lys
 1 5 10 15
 Tyr Leu Glu Gly Ala Ala Gly Gln Gln Pro Thr Ala Pro Asp Lys Ser
 20 25 30
 Lys Glu Thr Asn Lys Thr Asp Asn Thr Glu Ala Pro Val Thr Lys Ile
 35 40 45
 Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Thr Ala Thr Leu Ile Asp Glu Pro Thr
 50 55 60
 Glu Val Asp Asp Pro Trp Asn Leu Pro Thr Leu Gln Asp Ser Gly Ile
 65 70 75 80
 Lys Trp Ser Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys Ile Leu Cys Phe Phe Gln
 85 90 95

ES 2 637 174 T3

Gly Ile Gly Arg Leu Ile Leu Leu Leu Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Val
 100 105 110

Cys Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ser Ala Phe Gln Leu Val Gly Val Trp
 115 120 125

His Arg Arg Leu Lys Asn Gln Lys Ser Ala Lys Glu Gly Val Thr Val
 130 135 140

Leu Ile Asn Glu Asp Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Gly Leu Ala Ala
 145 150 155 160

Gly Val Gly Leu Ala Asn Ala Cys Tyr Ala Ile His Thr Leu Pro Thr
 165 170 175

Gln Glu Glu Ile Glu Asn Leu Pro Ala Phe Pro Arg Glu Lys Leu Thr
 180 185 190

Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly
 195 200 205

Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val Ala
 210 215 220

Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe
 225 230 235 240

Leu Lys Glu Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile Leu
 245 250 255

Lys Gln Leu Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu
 260 265 270

Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg
 275 280 285

Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val Asp
 290 295 300

Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met His
 305 310 315 320

Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Val Lys
 325 330 335

Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
 340 345 350

ES 2 637 174 T3

Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly Leu
 355 360 365

Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile Phe
 370 375 380

Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu Ile
 385 390 395 400

Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp Val
 405 410 415

Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys
 420 425 430

Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro
 435 440 445

Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe
 450 455 460

Arg Asn Phe Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn
 465 470 475 480

Asn Ser Gly Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val
 485 490 495

Ile Cys Leu Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr
 500 505 510

Lys Asn Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly
 515 520 525

Gln Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu
 530 535 540

Ser Cys Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Asp
 545 550 555 560

Phe Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu
 565 570 575

Gly Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser
 580 585 590

Asp

<210> 24
 <211> 2112
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

10 <400> 24

ES 2 637 174 T3

atgcacagga ggagaagcag gagctgtcgg gaagatcaga agccagtcac ggatgaccag 60
 cgcgacctta tctccaacaa tgagcaactg cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg 120
 gagagcaagt gcagccgcgg agccctgtac acaggctttt ccatcctggt gactctgctc 180
 ctgctggcc aggccaccac cgcctacttc ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa 240
 ctgacagtca cctcccagaa cctgcagctg gagaacctgc gcatgaagct tcccagcct 300
 cccaagcctg tgagcaagat ggcgatggcc accccgctgc tgatgcaggc gctgcccag 360
 ggagccctgc cccaggggccc catgcagaat gccaccaagt atggcaacat gacagaggac 420
 catgtgatgc acctgctcca gaatgctgac cccctgaagg tgtaccgcc actgaagggg 480
 agcttcccgg agaacctgag acaccttaag aacaccatgg agaccataga ctggaaggtc 540
 tttgagagct ggatgcacca ttggctcctg tttgaaatga gcaggcactc cttggagcaa 600
 aagcccactg acgctccacc gaaagatgat ttttgatac cagaaacaag tttcatactt 660
 actattatag ttggaatatt tctggttgtt acaatcccac tgacctttgt ctggcataga 720
 agattaaaga atcaaaaaag tgccaaggaa ggggtgacag tgcttataaa cgaagacaaa 780
 gagttggctg agctgcgagg tctggcagcc ggagtaggcc tggctaatac ctgctatgca 840
 atacatactc ttccaaccca agaggagatt gaaaatcttc ctgccttccc tcgggaaaaa 900
 ctgactctgc gtctcttgct gggaaagtga gcctttggag aagtgtatga aggaacagca 960
 gtggacatct taggagttgg aagtggagaa atcaaagtag cagtgaagac tttgaagaag 1020
 ggttccacag accaggagaa gattgaattc ctgaaggagg cacatctgat gagcaaattt 1080
 aatcatccca acattctgaa gcagcttga gtttgtctgc tgaatgaacc ccaatacatt 1140
 atcctggaac tgatggaggg aggagacctt cttacttatt tgcgtaaagc ccggatggca 1200
 acgttttatg gtcttttact caccttggtt gacctgtag acctgtgtgt agatatttca 1260
 aaaggctgtg tctacttga acggatgcat ttcattcaca gggatctggc agctagaat 1320
 tgccttgttt ccgtgaaaga ctataccagt ccacggatag tgaagattgg agactttgga 1380
 ctgcccagag acatctataa aatgattac tatagaaga gaggggaagg cctgctccca 1440
 gttcggtgga tggctccaga aagtttgatg gatggaatct tcaactactca atctgatgta 1500
 tggctttttg gaattctgat ttgggagatt ttaactottg gtcacagcc ttatccagct 1560
 cattccaacc ttgatgtgtt aaactatgtg caaacaggag ggagactgga gccaccaaga 1620
 aattgtcctg atgatctgtg gaatttaatg acccagtgtt gggctcaaga acccgaccaa 1680
 agacctactt tcatagaat tcaggaccaa cttcagttat tcagaaattt tttcttaaat 1740
 agcatttata agtccagaga tgaagcaaac aacagtggag tcataaatga aagctttgaa 1800
 ggtgaagatg gcgatgtgat ttgtttgaat tcagatgaca ttatgccagt tgctttaatg 1860
 gaaacgaaga accgagaagg gttaaactat atggactctg ctacagaatg tggccaagg 1920
 gaagaaaagt ctgagggctc tctaggctcc caggaatctg aatcttgtgg tctgagggaa 1980
 gaagagaagg aaccacatgc agacaaagat ttctgccaag aaaaacaagt ggcttactgc 2040
 ccttctggca agcctgaagg cctgaactat gcctgtctca ctcacagtgg atatggagat 2100
 gggctctgatt aa 2112

ES 2 637 174 T3

<210> 25
 <211> 700
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 25
 Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys Pro Val
 1 5 10 15

 Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asp Asp Glu Gln Leu Pro Met
 20 25 30

 Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr
 35 40 45

 Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr
 50 55 60

 Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val
 65 70 75 80

 Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys
 85 90 95

 Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met
 100 105 110

 Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met Gln Asn Ala
 115 120 125

10

ES 2 637 174 T3

Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His Leu Leu Gln
 130 135 140

Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly Ser Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile Asp Trp Lys
 165 170 175

Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser Arg
 180 185 190

His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys Asp Asp Phe
 195 200 205

Trp Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile Leu Thr Ile Ile Val Gly Ile Phe
 210 215 220

Leu Val Val Thr Ile Pro Leu Thr Phe Val Trp His Arg Arg Leu Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Lys Ser Ala Lys Glu Gly Val Thr Val Leu Ile Asn Glu Asp
 245 250 255

Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Gly Leu Ala Ala Gly Val Gly Leu Ala
 260 265 270

Asn Ala Cys Tyr Ala Ile His Thr Leu Pro Thr Gln Glu Glu Ile Glu
 275 280 285

Asn Leu Pro Ala Phe Pro Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu
 290 295 300

Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile
 305 310 315 320

Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val Ala Val Lys Thr Leu Lys
 325 330 335

Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe Leu Lys Glu Ala His
 340 345 350

Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile Leu Lys Gln Leu Gly Val
 355 360 365

Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu Glu Leu Met Glu Gly
 370 375 380

ES 2 637 174 T3

Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg Met Ala Thr Phe Tyr
 385 390 395 400

Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val Asp Leu Cys Val Asp Ile
 405 410 415

Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met His Phe Ile His Arg Asp
 420 425 430

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro
 435 440 445

Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys
 450 455 460

Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp
 465 470 475 480

Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile Phe Thr Thr Gln Ser Asp
 485 490 495

Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly His
 500 505 510

Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln
 515 520 525

Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp
 530 535 540

Asn Leu Met Thr Asn Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr
 545 550 555 560

Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe Leu
 565 570 575

Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn Asn Ser Gly Val Ile
 580 585 590

Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val Ile Cys Leu Asn Ser
 595 600 605

Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr Lys Asn Arg Glu Gly
 610 615 620

Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly Gln Gly Glu Glu Lys
 625 630 635 640

ES 2 637 174 T3

Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu Ser Cys Gly Leu Arg
 645 650 655

Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Lys Phe Cys Gln Glu Lys
 660 665 670

Glu Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu Gly Leu Asn Tyr Ala
 675 680 685

Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser Asp
 690 695 700

<210> 26
 <211> 1228
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

<400> 26
 gtatgtagct ttggccatca ttatggagca cctaggcaaa ggggtgggcaa cagtaaggag 60
 agtgcctatg aattccgcat tgcccaagac agtcatggtt tataccagtt tttctggcat 120
 aattattaat aacttcctct tccactctca aatgtgacct gggatggatg gaaaattatg 180
 tggttttaag aaaaatacag aaaaatccat tagtttcag tattttgtca tgtagctcaa 240
 aaacaaatga aagaaggaga aaaatattac attgaagaga atagatggta acatggttgg 300
 ttgacctgga ggcagtgttt gagaggagag gagttttgag agccttggtt tacgtggtca 360
 gccttaagtc aatcttactc catttcagaa gttgtgtgat gattgcccac aaaaccttct 420
 taagatagat gagttttgaa cttttgttgc cgtcataatt aaggaaaata ttcaagtgtc 480
 ttatgcaaag gttcattata ttaggatcta tgcaaaaagg aattaaatga tcataggcct 540
 tgctttcaga aatttataat gcaaggtgta aaaacaaagg atttgaagta gacacaaagg 600
 tgatctaaat cagctgttta gaggtgactt tcctttgagc aaatactcag catatctgct 660
 actcaagatt ctctattaaa aattgaaagc atttttaaca tagcagcatt ttccccctt 720
 gtagtattcc aagtgagaaa cttggccttt taaagttaac cttatggtga tggggttgat 780
 ttttttggtc atagtaaatt ttgttttacg taagatgtca catgtgtgaa atagctaaga 840
 gaaaagctta taaaccaga tgcatttatt actaatttgc agtagctttt tatacaaatt 900
 ggcaatctga agaagttaat acctactaac tttgactcaa caagctacaa taaaagtgtt 960
 gaggcaatgc atacacatat atatttttat caaaattaag gtgcctagaa gtggaccatc 1020
 atgctctgct tgggtaaaag gttgtagaat agtaaagtaa agtaattagg aaccctaaagt 1080
 tccacatcac cgtgtcacat aaaacacaca atactgcaaa gccatgagat atttctttct 1140
 ctctcaaaca caaataccaa taccaacaca aacttgtaca ccctatatat gtggagggtg 1200
 gggagacaaa aatggttgcata ttttacag 1228

<210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido Nucleótido Sintético

5 <400> 27
 acccttctcg gttcttggtt tcca 24

<210> 28
 <211> 24
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

15 <400> 28
 tctggcgagt ccaaagtctc caat 24

<210> 29
 <211> 24
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido Nucleótido Sintético

25 <400> 29
 cagcaagaga cgcagagtca gttt 24

<210> 30
 <211> 24
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

<400> 30
 35 actgtgcaaa gtgctgactc tggt 24

<210> 31
 <211> 24
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

<400> 31
 45 cagcaagaga cgcagagtca gttt 24

<210> 32
 <211> 24
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

<400> 32
 55 ttggataagg aactggcagg aagg 24

<210> 33
 <211> 24
 60 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

65

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

5 <400> 33
 accgtcatct agcggagttt cact 24

<210> 34
 <211> 24
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

15 <400> 34
 agccaaggtc ctgcttatgt ctgt 24

<210> 35
 <211> 24
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

25 <400> 35
 tctggcgagt ccaaagtctc caat 24

<210> 36
 <211> 20
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

35 <400> 36
 tggaaatccc atcaccatct 20

40 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Nucleótido Sintético

50 <400> 37
 gtcttctggg tggcagtgat 20

<210> 38
 <211> 24
 <212> DNA
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

60 <400> 38
 ttggataagg aactggcagg aagg 24

<210> 39
 <211> 24
 65 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

5 <400> 39
 cagcaagaga cgcagagtca gtt 24

<210> 40
 <211> 24
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

15 <400> 40
 tgtggctct gaagtgatt ctga 24

<210> 41
 <211> 24
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

25 <400> 41
 gcagctcagc caactcttg tctt 24

<210> 42
 <211> 20
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Nucleótido Sintético

<400> 42
 40 atgctggcgg gcggtccatg 20

<210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Nucleótido Sintético

<400> 43
 50 ttaatcagac ccatctccat 20

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 44
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10

<210> 45
 <211> 14
 65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 45
 Ala Gly Ala Gly Cys Gly Gln Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly
 1 5 10

<210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 46
 Ala Gly Ala Gly Ser Gly Lys Pro Glu Gly Leu Asn Tyr Ala
 1 5 10

20

<210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Péptido sintético

30

<400> 47
 Ala Gly Ala Gly Gly Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser
 1 5 10

<210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

40

<400> 48
 Ala Gly Ala Gly Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly
 1 5 10

<210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Péptido sintético

50

<400> 49
 Ala Gly Ala Gly Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser Asp
 1 5 10

<210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Péptido sintético

60

<400> 50

Ala Gly Ala Gly Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln
 1 5 10

<210> 51
 <211> 14
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

10 <400> 51
 Ala Gly Ala Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu Ser Cys
 1 5 10

<210> 52
 15 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Péptido sintético

<400> 52
 Ala Gly Ala Gly Glu Ser Glu Ser Cys Gly Leu Arg Lys Glu
 1 5 10

25 <210> 53
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 53
 Ala Gly Ala Gly Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His
 1 5 10

35 <210> 54
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 54
 Ala Gly Ala Gly Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Asp Phe
 45 1 5 10

<210> 55
 <211> 14
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

55 <400> 55
 Ala Gly Ala Gly Ala Asp Lys Asp Phe Cys Gln Glu Lys Gln
 1 5 10

<210> 56
 <211> 14
 60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 56
 Ala Gly Ala Gly Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro
 1 5 10

<210> 57

10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 57
 Ala Gly Ala Gly Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu
 1 5 10

20 <210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Péptido sintético

<400> 58
 Ala Gly Ala Gly Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu
 1 5 10

30 <210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 59
 Ala Gly Ser Thr Leu Pro
 1 5

40 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

50 <400> 60
 Leu Gln Val Trp His Arg
 1 5

<210> 61
 <211> 6
 <212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

60

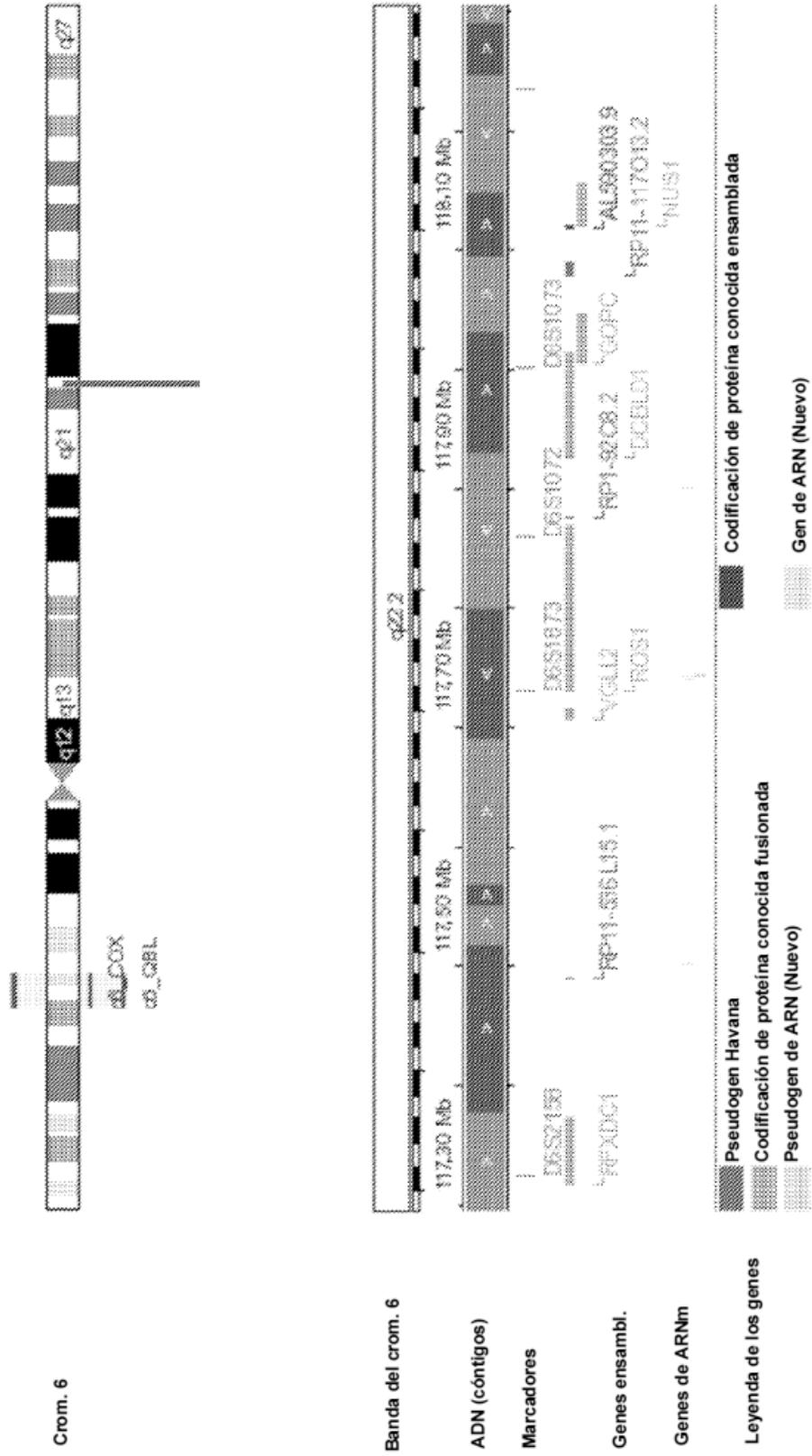
<400> 61
Leu Gln Ala Gly Val Pro
1 5

5

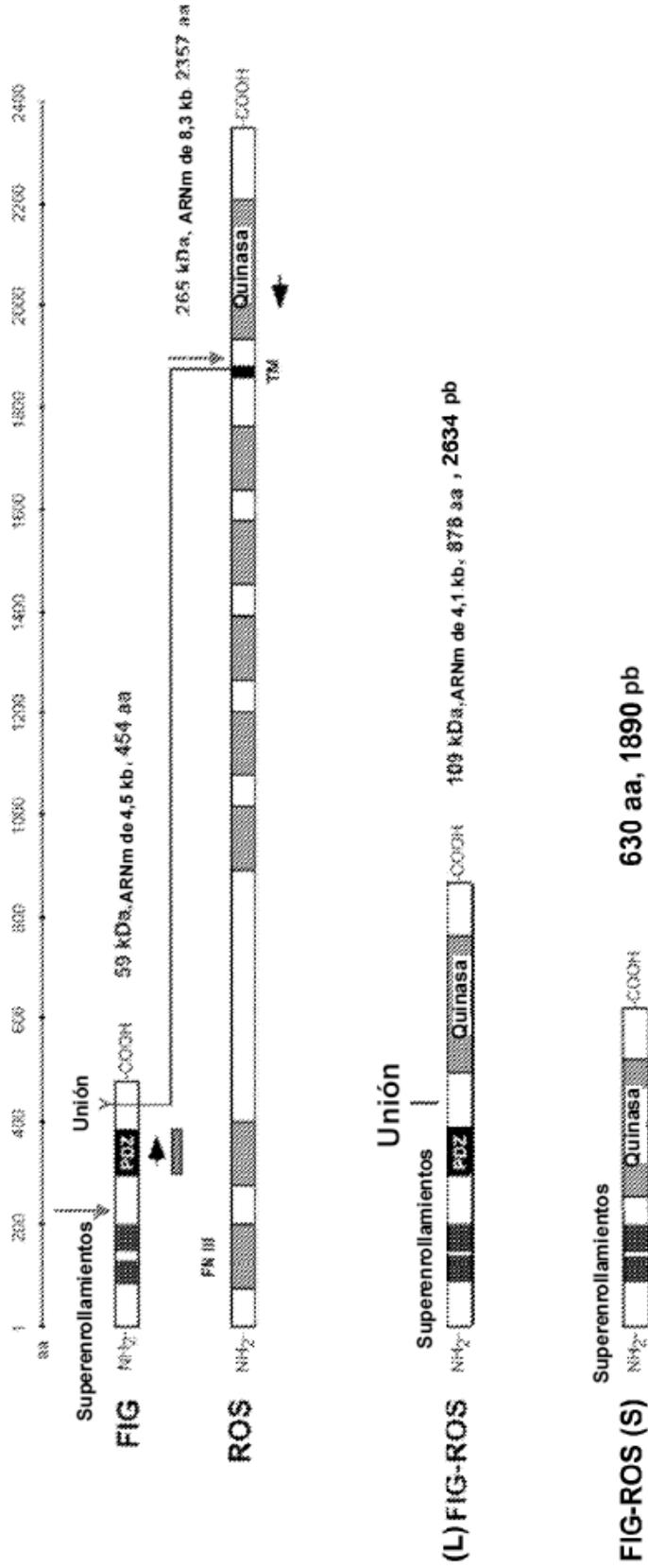
REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de ROS para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer se caracteriza por una translocación del gen de ROS o expresa un polipéptido FIG-ROS, y el inhibidor de ROS se selecciona entre NVP-TAE684 y PF-02341066.
- 5 2. El inhibidor de ROS según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el paciente ha sido identificado como que tiene un cáncer que se caracteriza por una translocación del gen de ROS y que expresa un polipéptido FIG-ROS.
3. El inhibidor de ROS según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el cáncer es cáncer de hígado.
- 10 4. Un inhibidor de ROS para su uso en la inhibición de la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto, en donde la célula presenta una translocación del gen de ROS o expresa un polipéptido FIG-ROS, y el inhibidor de ROS se selecciona entre NVP-TAE684 y PF-02341066.
5. El inhibidor de ROS según la reivindicación 4 para su uso según la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de hígado.
- 15 6. Un inhibidor de ROS para su uso en la inhibición de la actividad quinasa de un polipéptido en un sujeto que comprende un dominio ROS quinasa, en donde el inhibidor de ROS se selecciona entre NVP-TAE684 y PF-02341066.
7. El inhibidor de ROS según la reivindicación 3 o la reivindicación 5 para su uso según la reivindicación 3 o la reivindicación 5, en donde el cáncer de hígado es carcinoma hepatocelular o colangiocarcinoma.
- 20 8. El inhibidor de ROS según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inhibidor de ROS es PF-02341066.

Figura 1: Información genómica de FIG-ROS



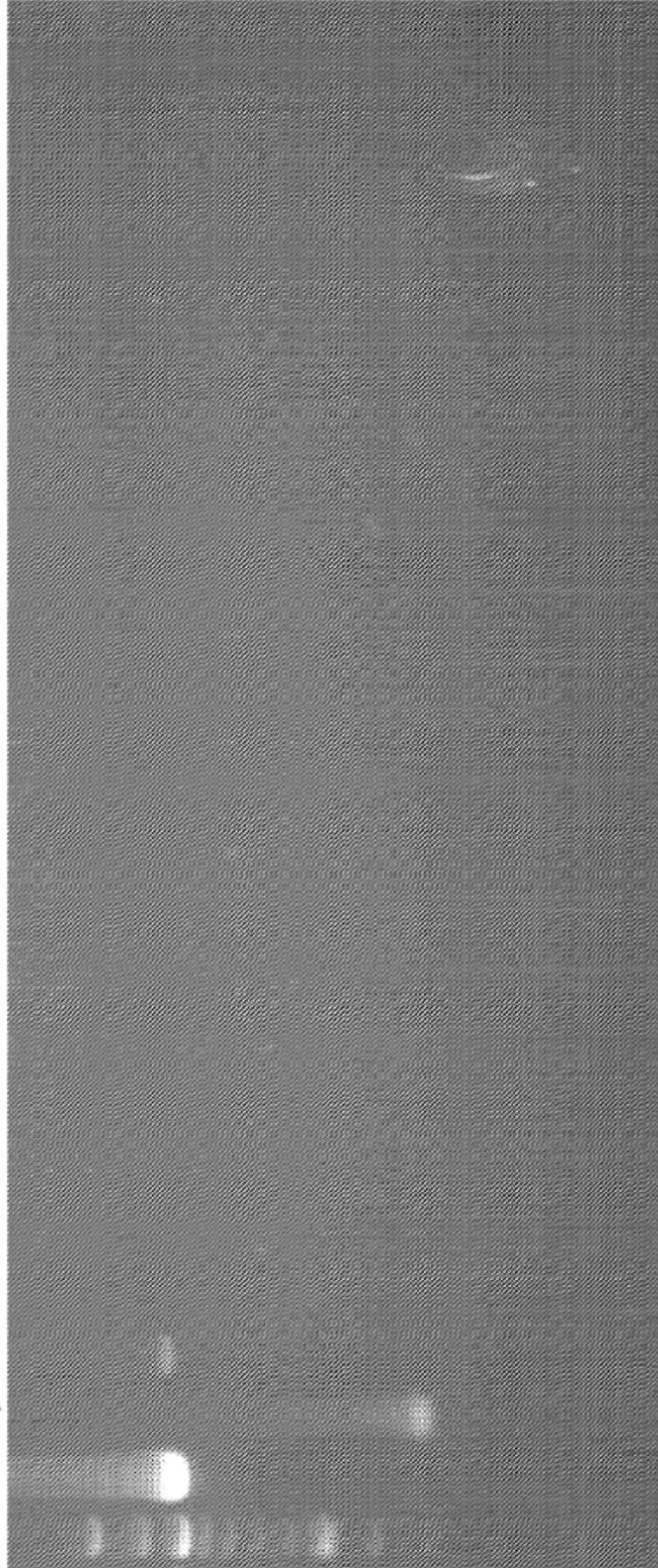
**Figura 2:
FIG-ROS en cáncer hepático**



- FIG-ROS (L): exón 7 de FIG fusionado al exón 34 de ROS
- FIG-ROS (S): exón 3 de FIG fusionado al exón 35 de ROS

**Figura 3:
Expresión de FIG-ROS en cáncer hepático**

U178MG
XY3-78T
0906651C



2/23=8,7 %

Figura 4: Expresión de FIG-ROS en muestras positivas en MS

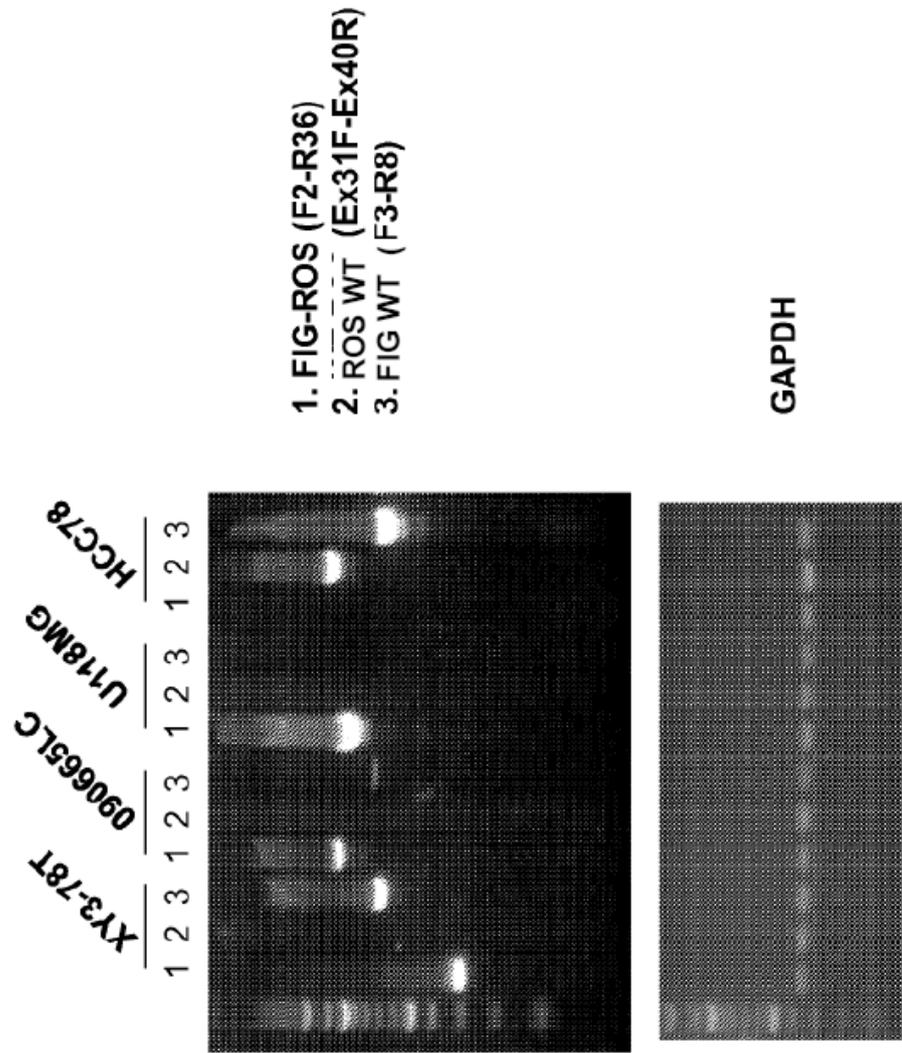


Figura 5: PCR genómica de FIG-ROS

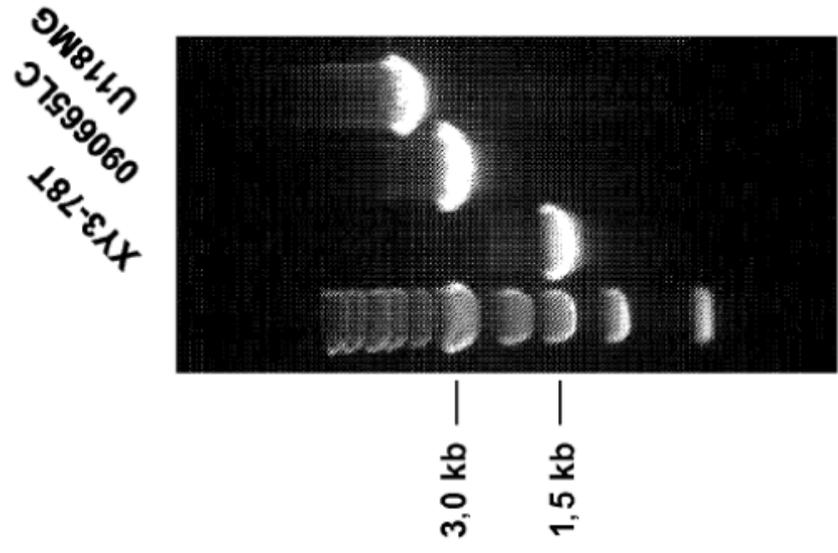


Figura 6: Expresión estable de fusiones de FIG-ROS

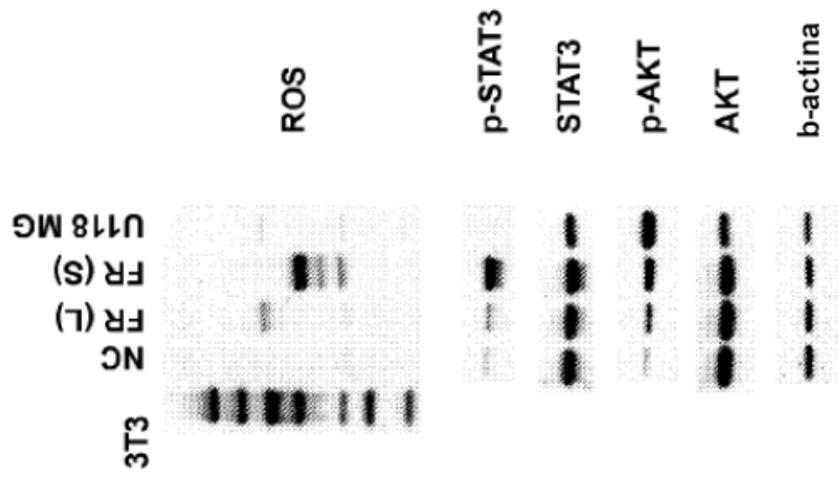


Figura 7: Ensayo de agar blando (células 3T3)

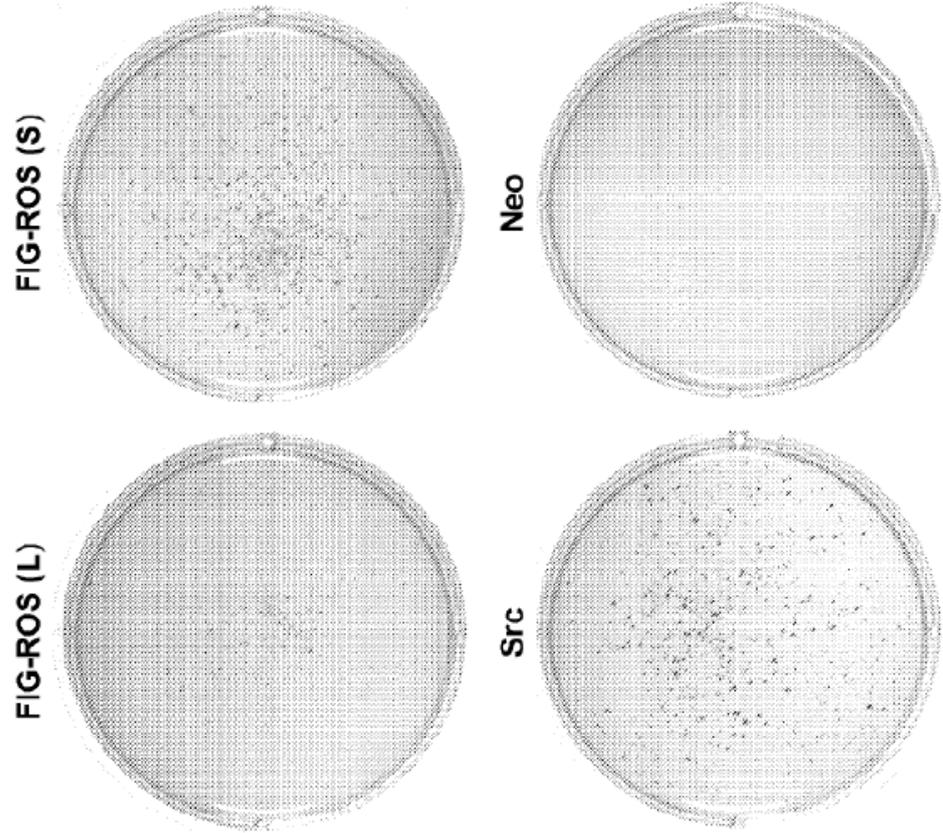
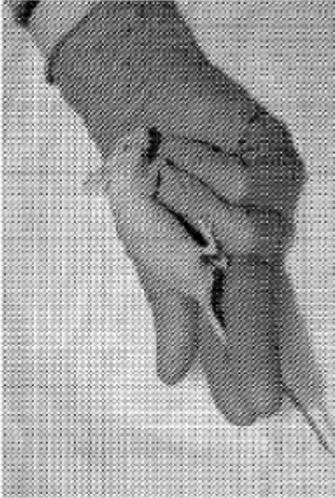
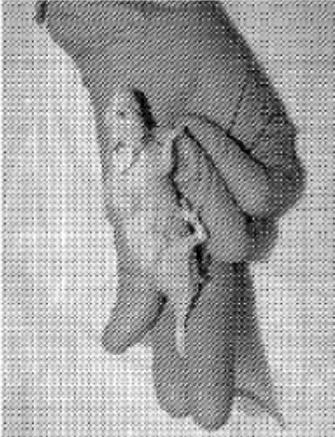
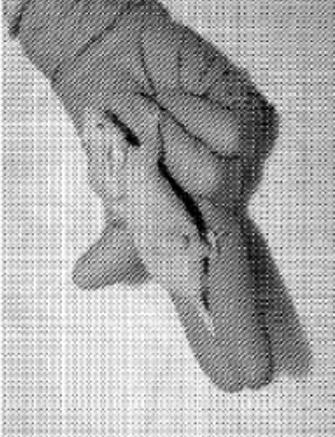


Figura 8: Actividad de transformación de FIG-ROS

	Neo	FIG-ROS (L)	FIG-ROS (S)
Ratones desnudos (Día 16)			
Tumor/Inyección	0/8	8/8	8/8

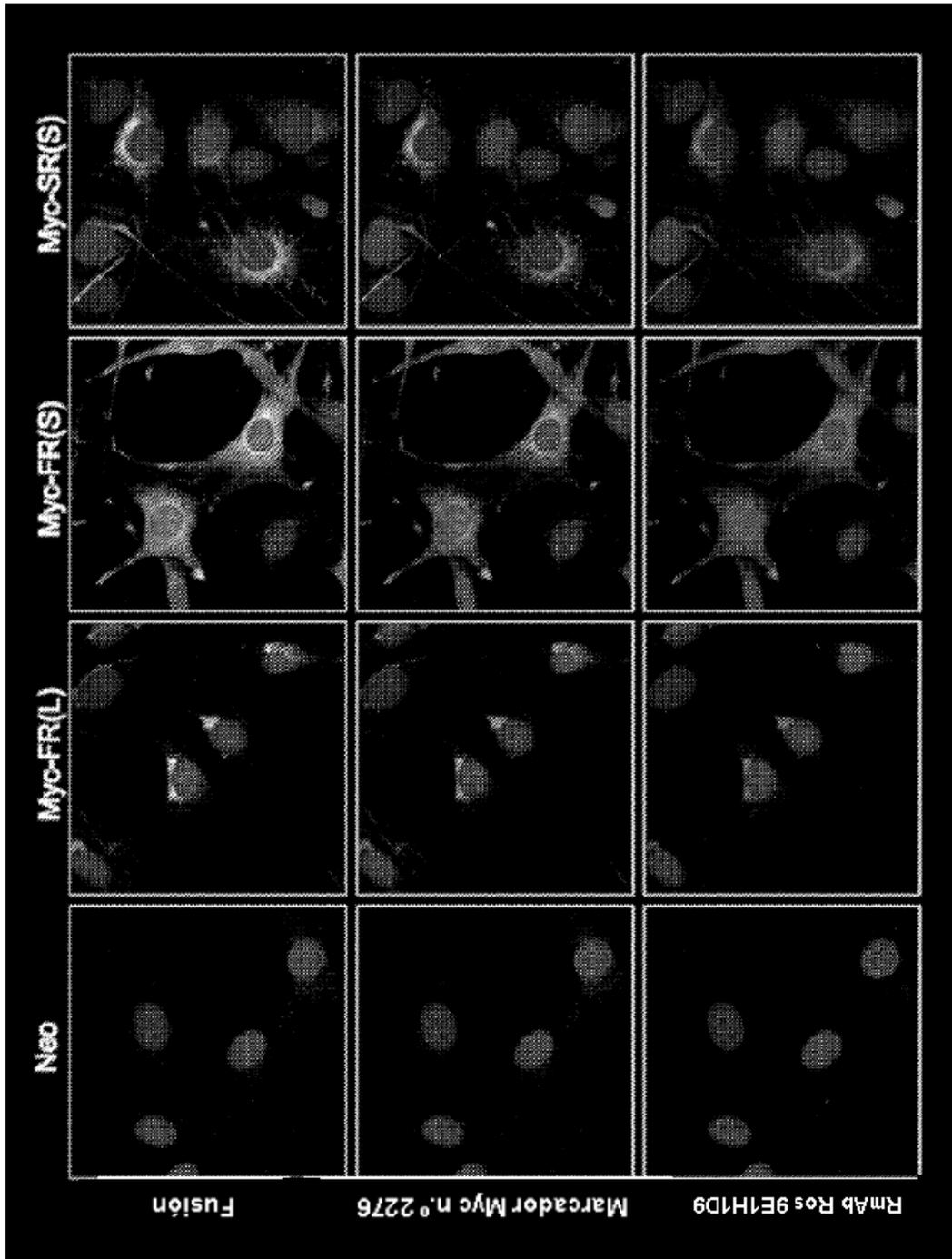


Figura 9A: Localización subcelular de fusiones FIG-ROS

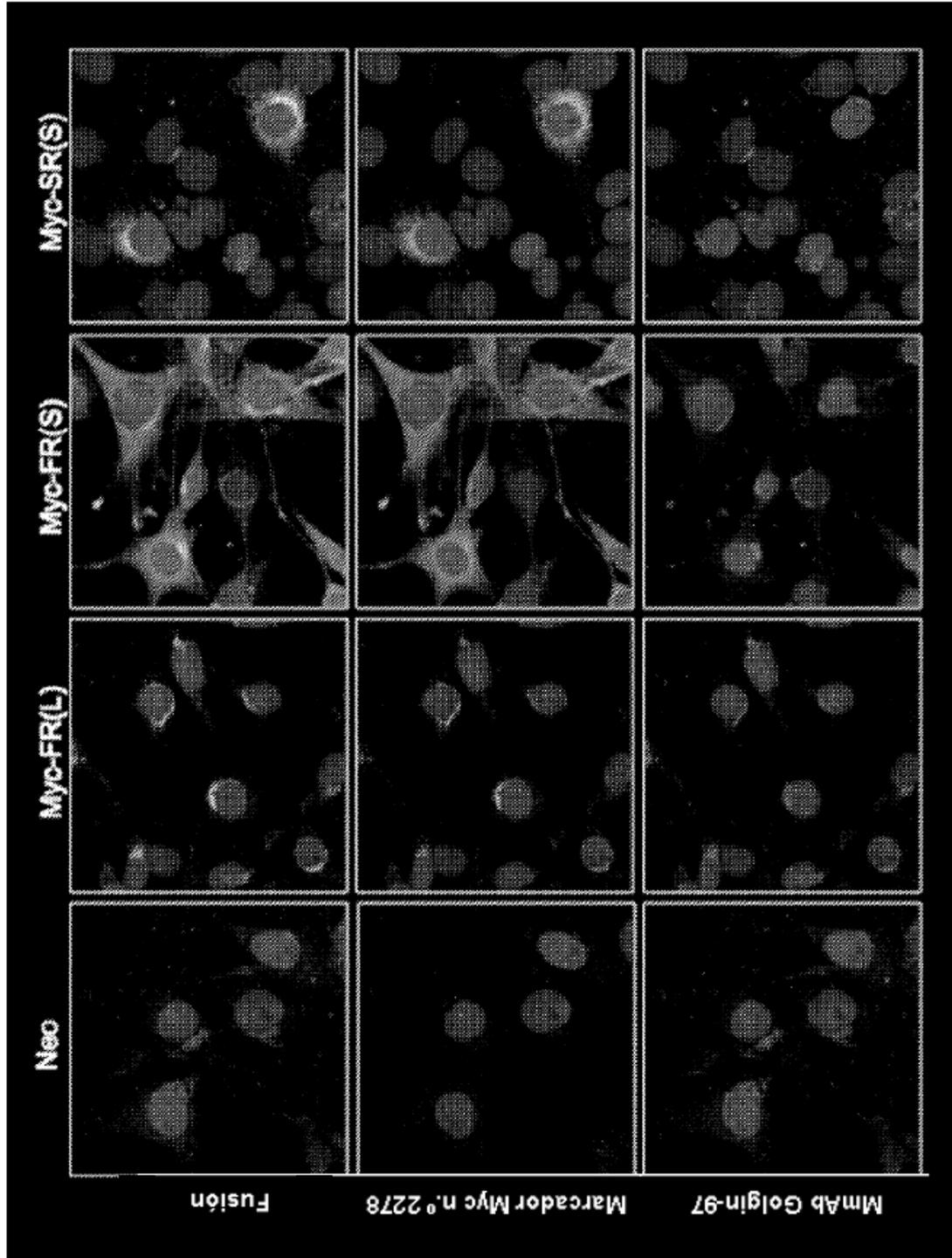


Figura 9B: Localización subcelular de fusiones FIG-ROS

Figura 10: Expresión estable de fusiones de FIG-ROS

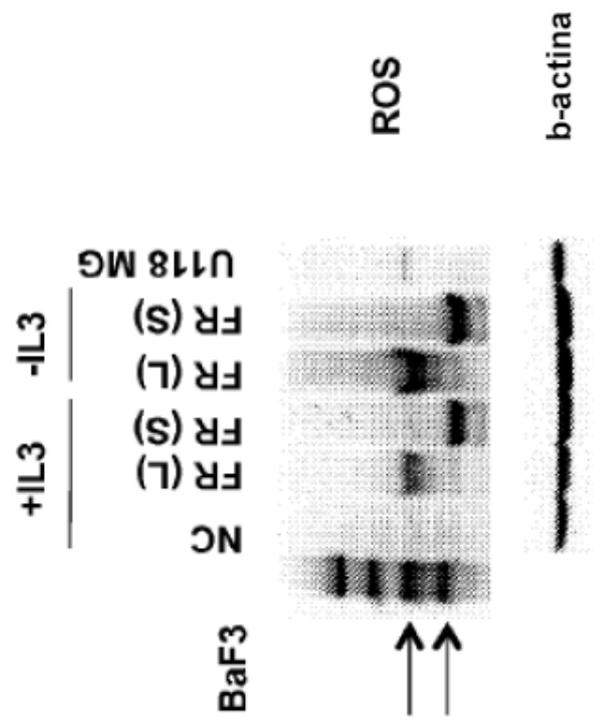


Figura 11: Crecimiento independiente de IL3 (células BaF3)

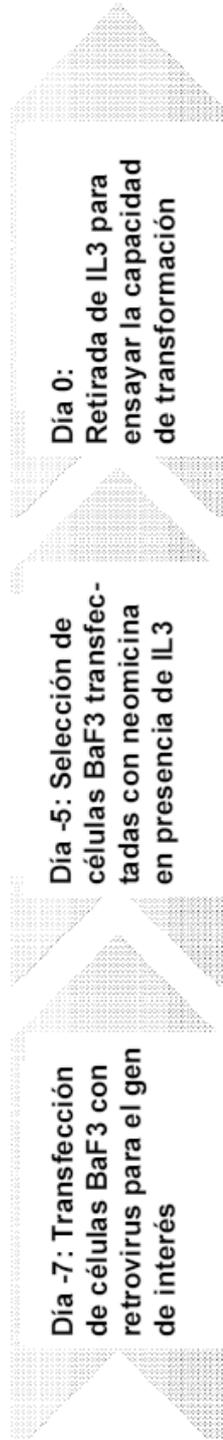
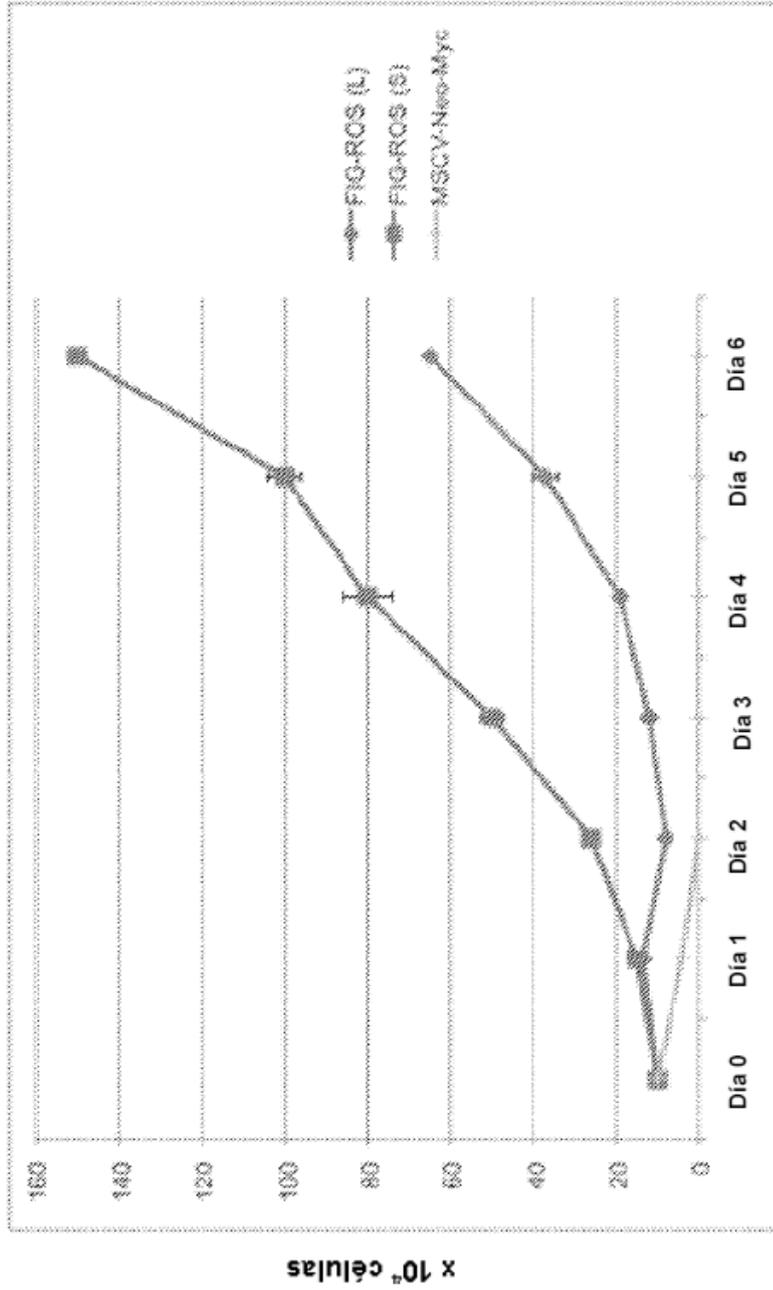


Figura 12: Ensayo de quinasa in vitro

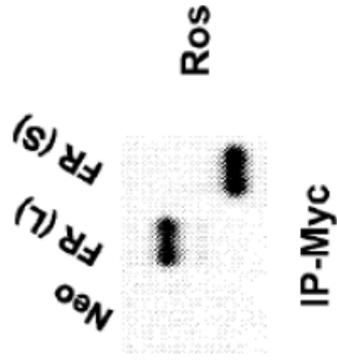
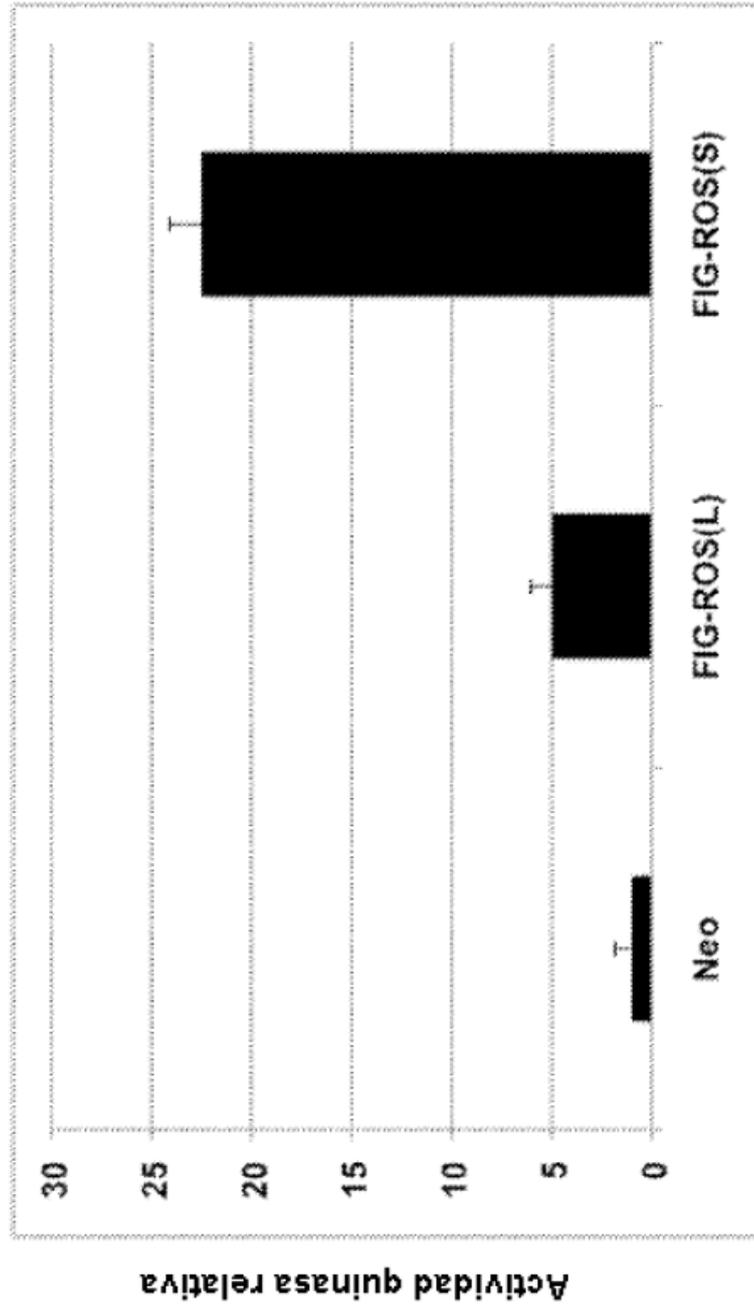


Figura 13:
FIG-ROS es sensible a TAE-684

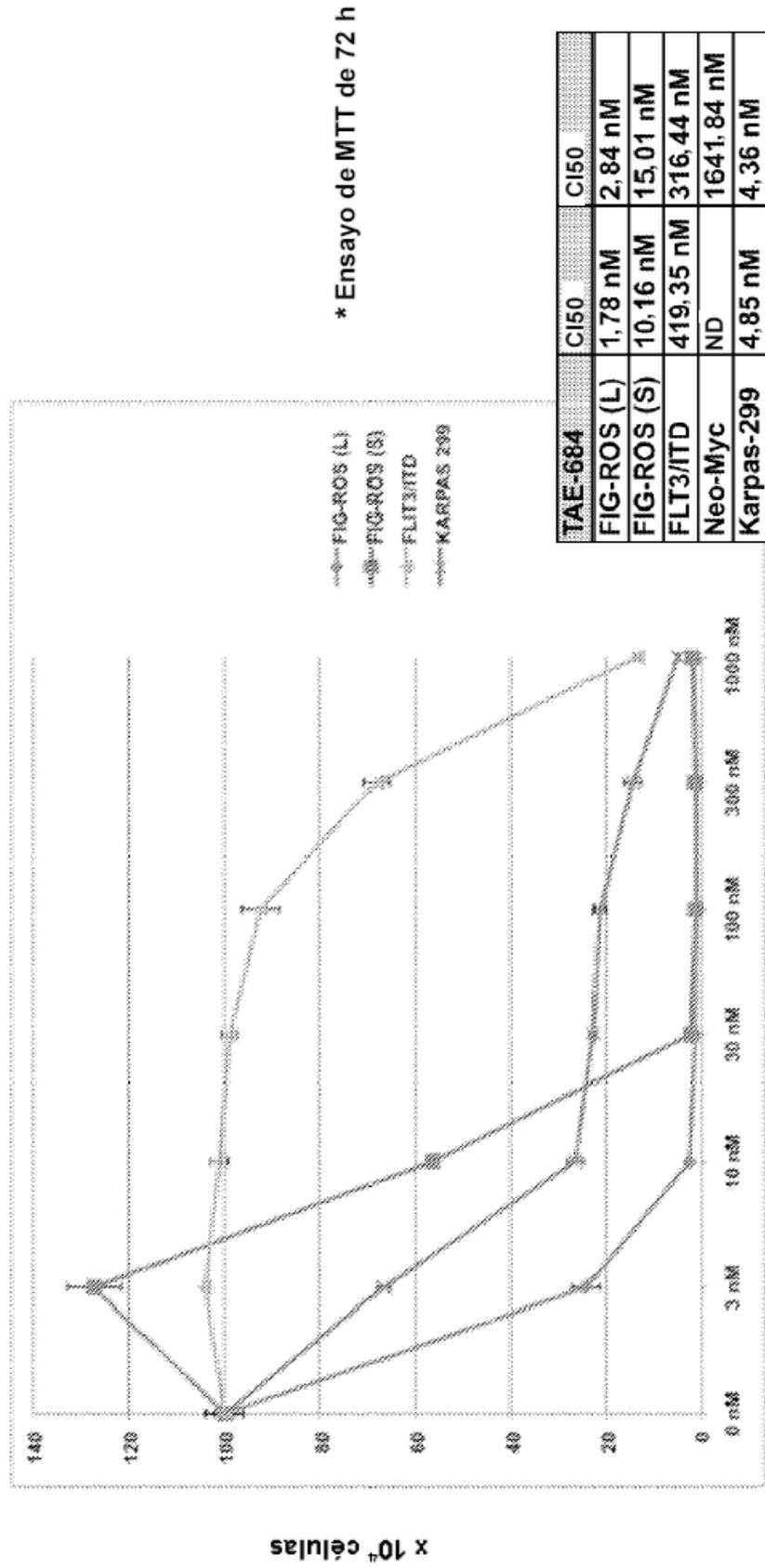


Figura 14: TAE-684 induce la apoptosis en células BaF3 con expresión de FIG-ROS

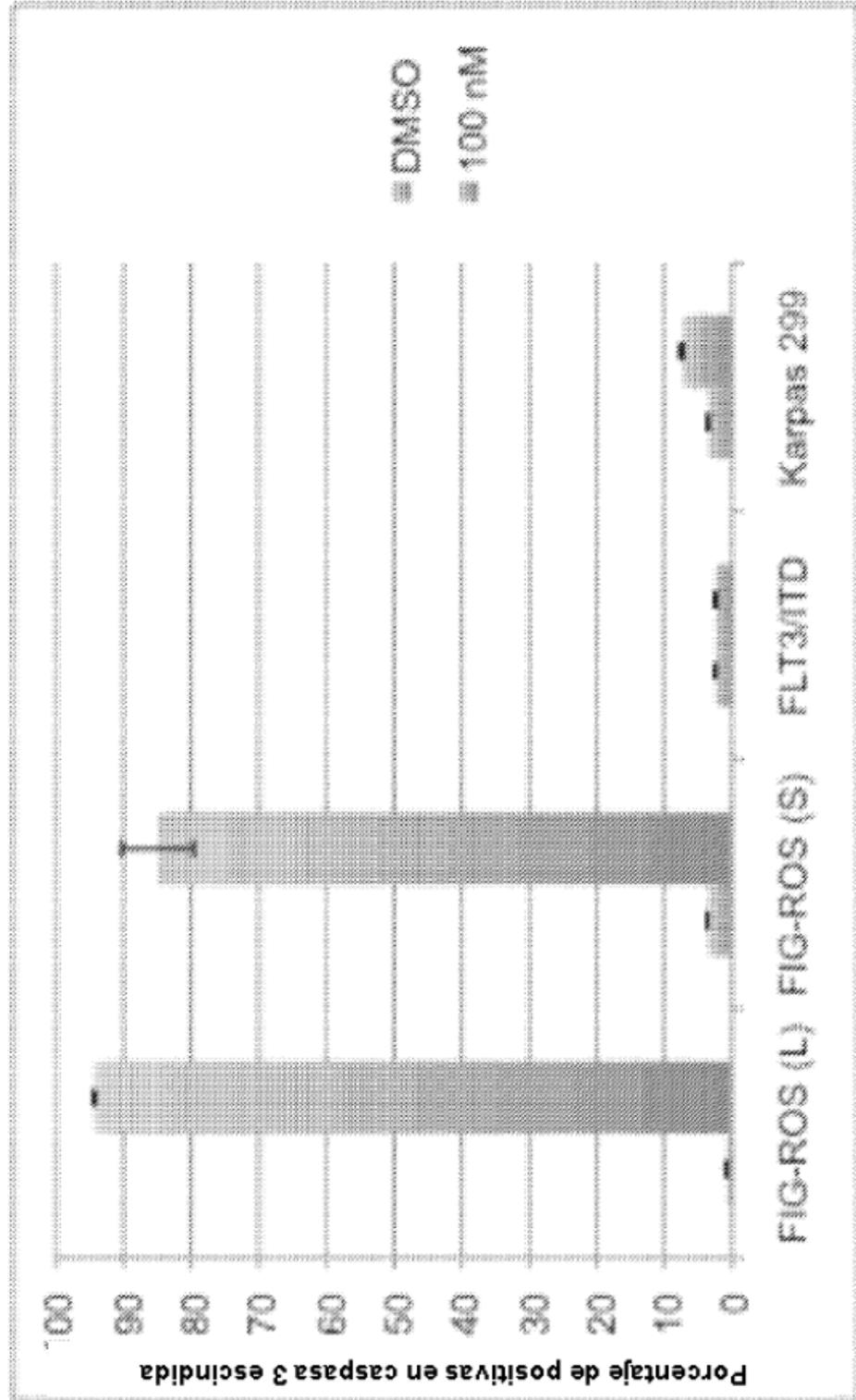


Figura 15: La fosforilación de FIG-ROS se inhibe mediante TAE-684

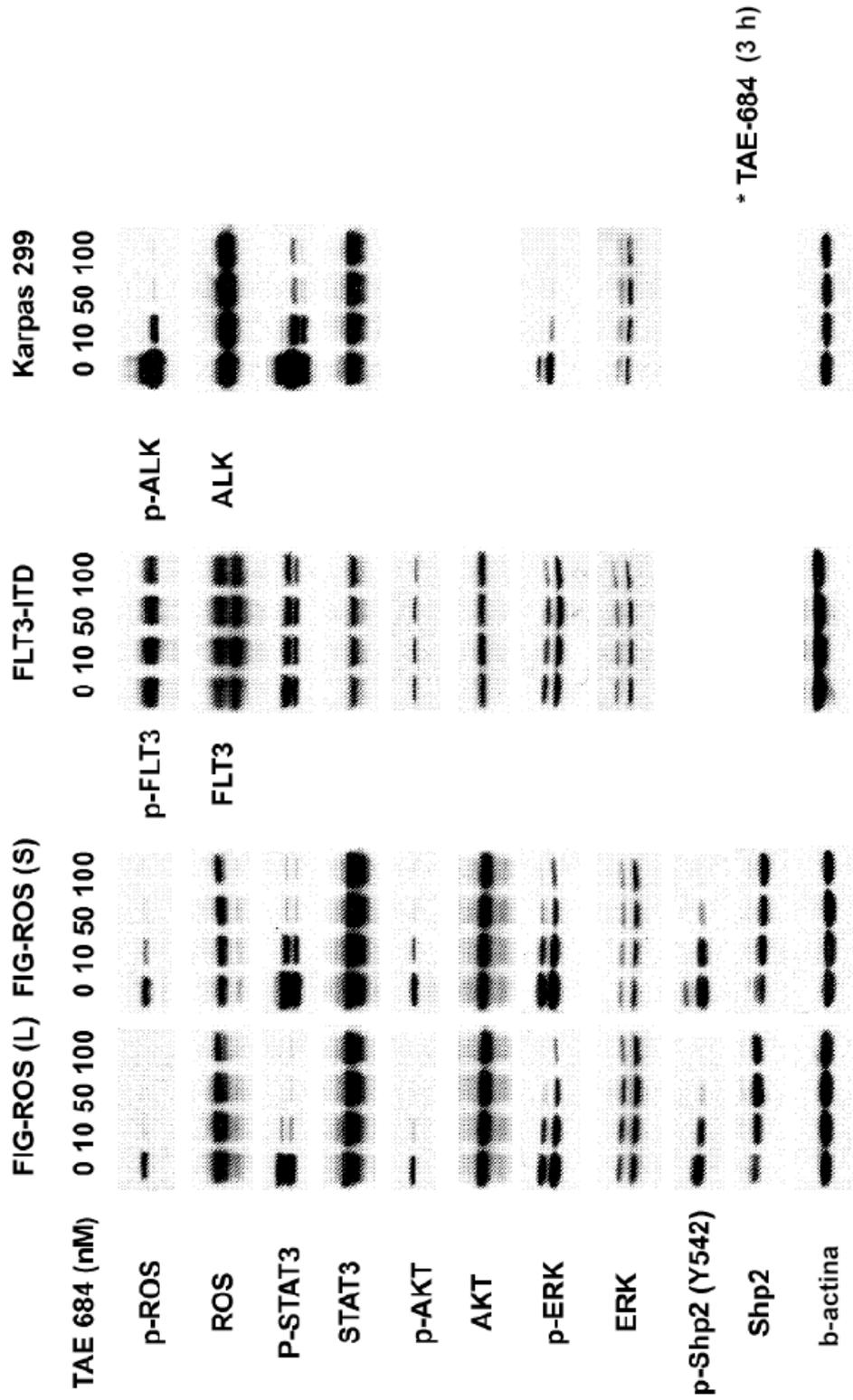


Figura 17

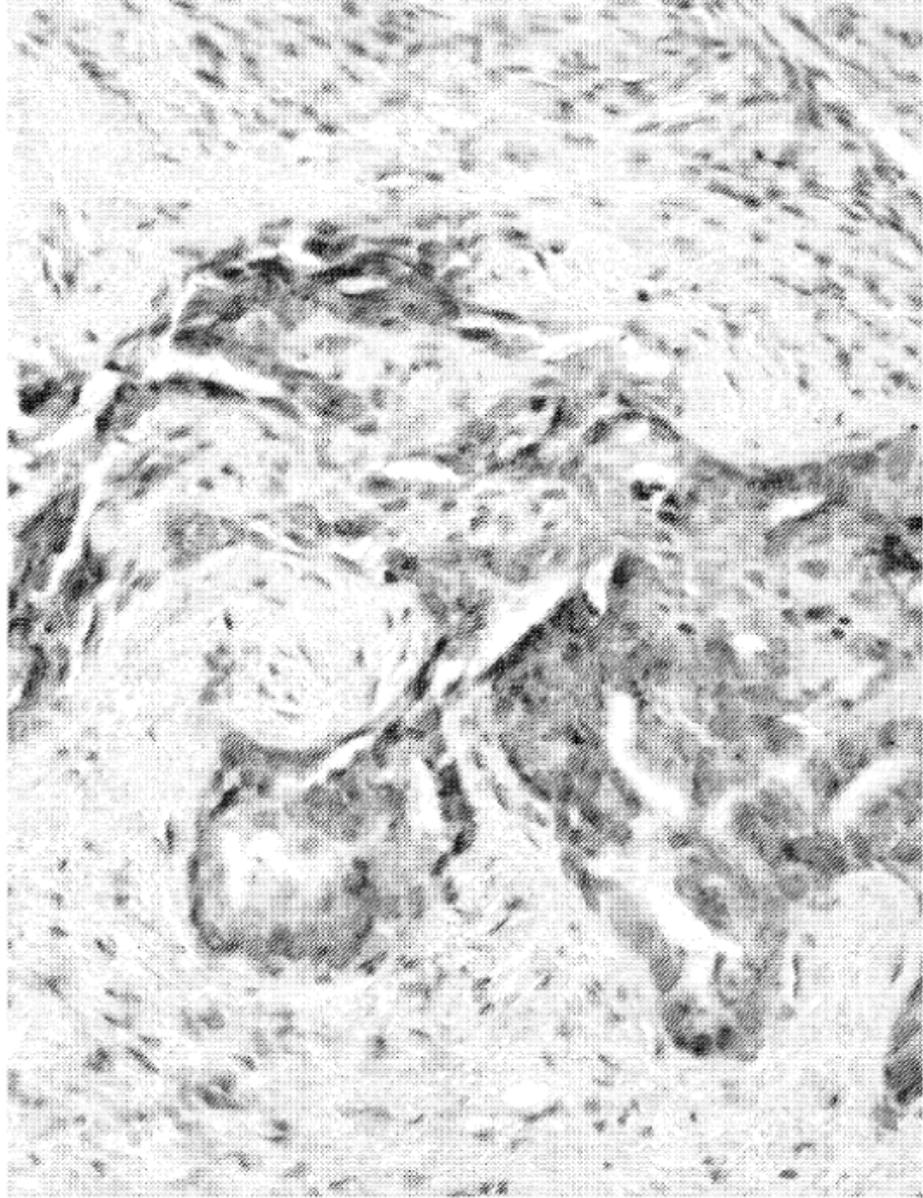


Figura 18

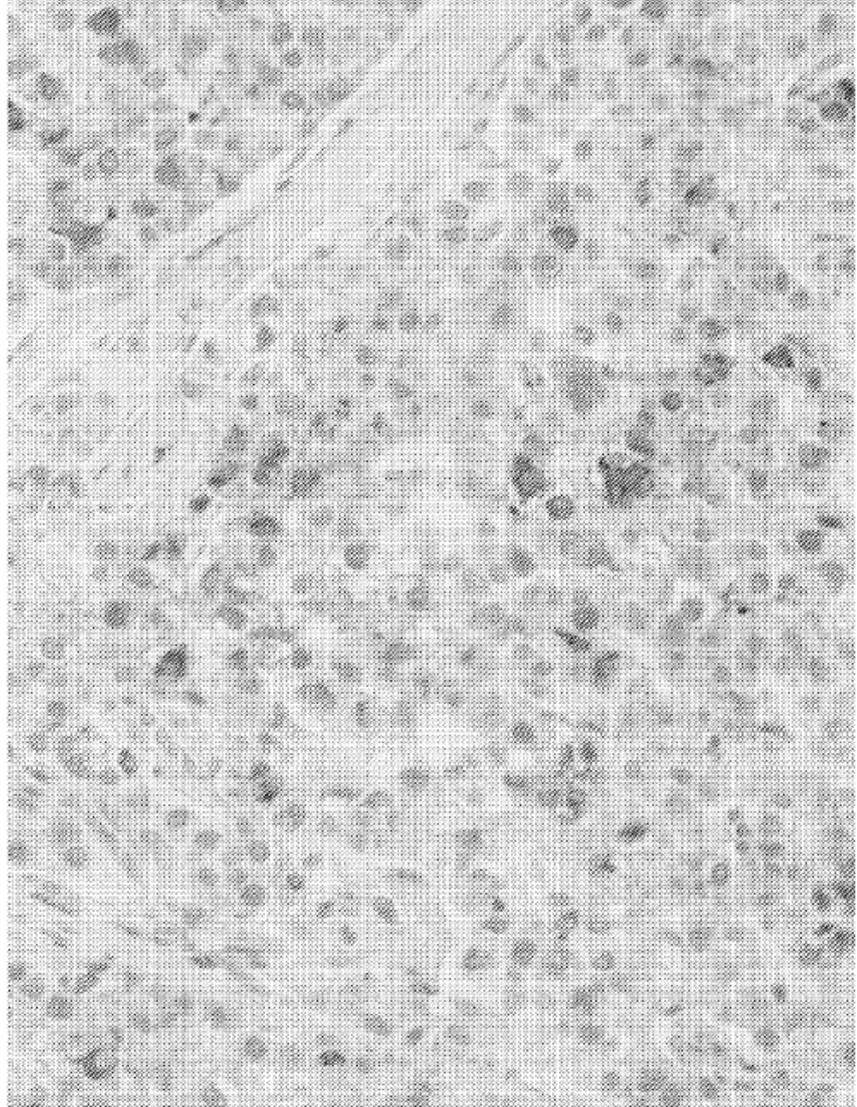


Figura 19A

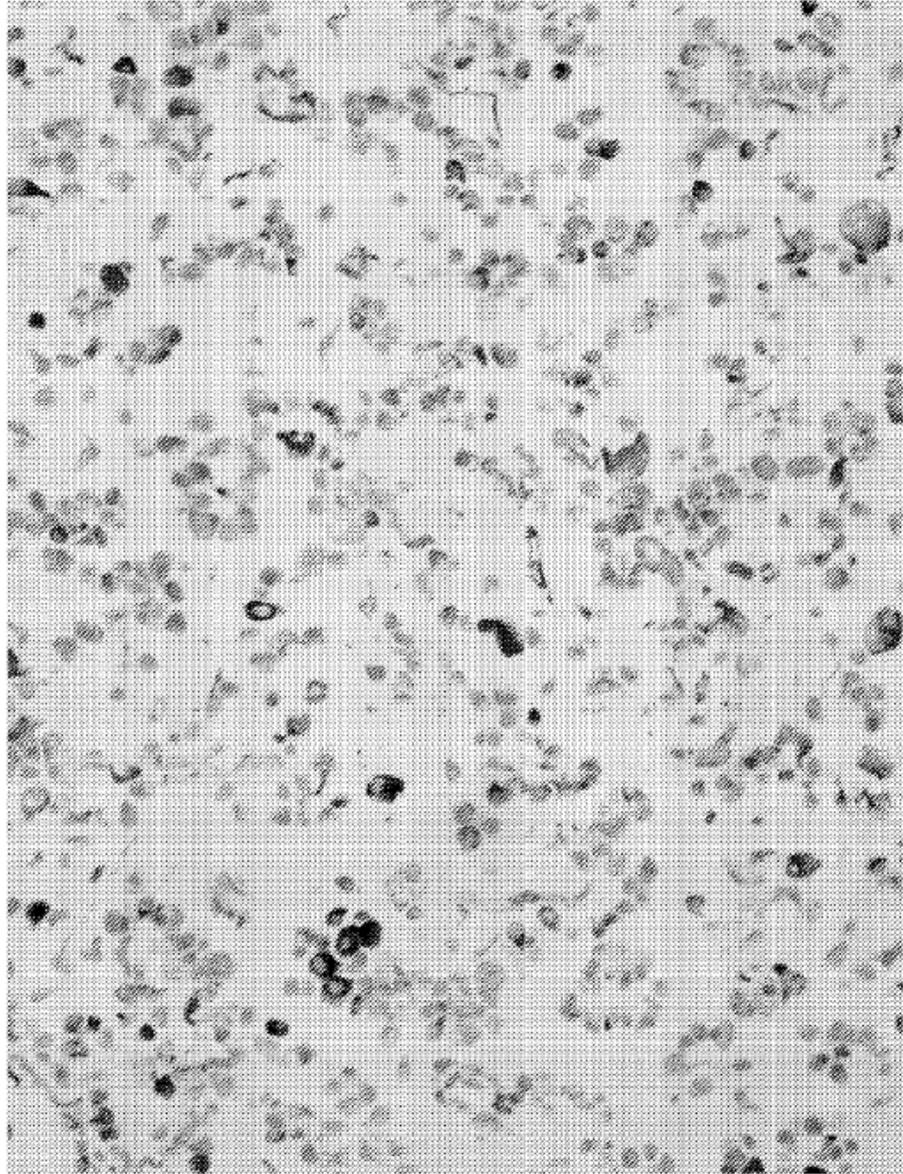


Figura 19B

